

Charakterisierung der Stammzellfaktoren NANOG1 und NANOG2 auf Protein- und Genebene in embryonalen Karzinomazellen und in t(4;11)- Zellpopulationen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Irina Eberle
aus Dschambul

Frankfurt, 2009
(DF1)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation:

Meinen Eltern und meiner Schwester
für die beste Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	I
2 Einleitung.....	3
2.1 Definition von Stammzellen.....	3
2.1.1 Embryonale Stammzellen.....	3
2.1.2 Gewebespezifische Stammzellen.....	3
2.1.3 Hämatopoetische Stammzellen.....	5
2.1.4 Krebsstammzellen.....	6
2.1.5 Gemeinsame Eigenschaften der Stammzellen.....	8
2.1.5.1 DNA-Methylierung durch DNMT3A/B.....	9
2.2 NANOG-Expression.....	11
2.3 Genregulation.....	14
2.3.1 Murine Regulation.....	14
2.3.2 Humane Regulation.....	16
2.3.3 Epigenetische Regulation.....	17
2.4 Genaufbau.....	18
2.4.1 Genduplikation, Pseudogene und Retrogene.....	19
2.4.2 NANOG-Genkopien.....	21
2.5 Funktionelle Domänen und Funktion von NANOG.....	25
2.6 Wirkmechanismus und Zielgene von NANOG1.....	27
2.6.1 Modifikationen und Komplexpartner.....	27
2.6.2 Zielgene von NANOG1.....	28
2.7 t(4;11)-Leukämie.....	30
2.7.1 Leukämieentstehung.....	30
2.7.2 Klinische Charakteristika einer t(4;11)-assoziierten Leukämie.....	31
2.8 Molekulare Grundlagen der t(4;11)-Translokation.....	31
2.8.1 Funktionelle Domänen und Funktion von MLL.....	31
2.8.2 Struktur und Funktion von AF4.....	34
2.8.3 Funktion der Fusionsproteine Derivat 11 und Derivat 4.....	35

2.9 Zielsetzung der Arbeit.....	36
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Genexpressionsanalyse von NANOG1 und seiner Zielgene in t(4;11)-Zellen, anderen Tumorzelllinien und Kontrollzellen aus gesunden Probanden.....	38
3.1.1 Transkriptionsanalysen der NANOG1-Zielgene.....	38
3.1.2 Analyse der transkribierten NANOG1-Zielgene in t(4;11)-Patientenzellen.....	40
3.1.3 Transkriptionsanalyse der NANOG1-Zielgene in humanen Zelllinien.....	42
3.1.4 Transkriptionsanalyse der NANOG1-Zielgene in gesunden Probanden.....	45
3.2 Charakterisierung der regulatorischen Regionen vor den <i>NANOG</i> -Genen.....	46
3.2.1 Überprüfung der <i>NANOG</i> -Gentranskription in humanen Zelllinien mit <i>MLL</i> -Translokation.....	46
3.2.2 Überprüfung der <i>NANOG2</i> - und <i>NANOGP8</i> -Transkription.....	48
3.2.3 Sequenzierung von <i>NANOG</i> -Transkripten aus der t(4;11)-Zelllinie SEM...	49
3.2.4 Analyse des 5' Endes der <i>NANOG2</i> -Transkripte.....	50
3.2.5 Direkter Nachweis der <i>NANOG1/2</i> -Transkripte in Zelllinien.....	55
3.2.6 <i>NANOG1/2</i> -Nachweis in t(4;11)-Patientenzellen, AML-Patientenzellen und gesunden Probanden.....	56
3.2.7 Analyse der regulatorischen Bereiche vor <i>NANOG1</i> - und <i>NANOG2</i> - Genen mittels des ChIP-Experiments.....	58
3.2.8 Analyse der regulatorischen Region in embryonalen und nicht- embryonalen Zelllinien mit Hilfe des Reporter-genexperiments.....	62
3.3 Charakterisierung der NANOG-Proteine mittels immunologischer Experimente.....	63
3.3.1 Analyse der NANOG-Expression in NTERA-2- und SEM-Zellen.....	63
3.3.2 Analyse des möglichen Abbaus der NANOG1-Proteine.....	64
3.3.3 Theoretische Bestimmung der unterschiedlichen NANOG1- und NANOG2-Proteine.....	66
3.3.4 Proteinexpression in HEK-293T-Zellen.....	68
3.3.5 Western-Blot-Analyse der in HEK-293T produzierten Proteine.....	69
3.3.6 Proteinanalyse mit Hilfe von MALDI-MS/MS.....	71
3.3.7 Charakterisierung der Proteinmodifikation.....	72
3.3.8 Massenvergleich zwischen gereinigten NANOG-Proteinvarianten und den in Zelllysaten detektierten NANOG-Proteinen.....	74

3.3.9	Analyse des Zielkompartiments von verschiedenen NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten.....	75
3.4	Funktionelle Analysen.....	76
3.4.1	Ektopische NANOG1- und NANOG2-Expression in HEK-293wt-Zellen...	76
3.4.1.1	Überprüfung der NANOG-Synthese in HEK-293wt-Zellen auf Genom- und Proteinebene.....	76
3.4.1.2	Analyse des Genexpressionsprofils epigenetischer Gene mittels des cDNA Micro Arrays.....	78
3.4.1.3	Verifizierung der Expressionsdaten mittels der RT-PCR.....	81
3.4.1.4	Genexpressionsanalyse mit einem Affymetrix Micro Array.....	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Identifikation der neuen <i>NANOG1</i> - und <i>NANOG2</i> -Genstrukturen und der regulatorischen Regionen vor den beiden Genen.....	86
4.2	Untersuchung der NANOG-Expression.....	89
4.3	Regulation der Zelle über NANOG1 und NANOG2.....	91
5	Material und Methoden.....	97
5.1	Material.....	97
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen.....	97
5.1.2	Pufferlösungen und Medien.....	100
5.1.3	Synthetische Oligonukleotide.....	103
5.1.4	Verwendete Organismen.....	105
5.1.5	Für die Klonierung verwendete Vektoren.....	107
5.1.6	Verwendete Antikörper.....	111
5.2	Standardmethoden.....	112
5.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	112
5.2.2	Sequenzanalysen.....	113
5.2.3	RNA-Isolierung und Reverse Transkription.....	113
5.3	PCR-Techniken.....	114
5.3.1	RT-PCR-Experimente.....	114
5.3.2	PCR-Reaktionen.....	114

5.3.3	RACE-Experiment.....	115
5.4	Transfektionstechniken.....	116
5.4.1	Lipotransfektion in HEK-293T-Zellen.....	116
5.4.2	CaPO ₄ -Transfektion in HEK-293wt-Zellen.....	117
5.4.3	CaPO ₄ -Transfektion in HeLa-Zellen.....	117
5.4.4	Lipotransfektion mit Amaxa-Kit in NTERA-2-Zellen.....	118
5.5	Proteinaufreinigungsmethoden.....	118
5.5.1	Aufreinigung der NANOG-Proteinvarianten.....	118
5.5.2	Proteinaufreinigung für MALDI-MS.....	119
5.6	Immunodetektion.....	120
5.6.1	Western-Blot-Experiment.....	120
5.6.2	Immunohistologisches Experiment.....	121
5.6.3	Immunopräzipitationsexperiment.....	121
5.7	Etablierung einer stabilen Zelllinie.....	122
5.7.1	Etablierung der NANOG1/2 produzierenden HEK-293wt-Zelllinien.....	122
5.7.2	Verifizierung der <i>NANOG1/2</i> -Transkription.....	122
5.8	Promotoranalyse.....	123
5.8.1	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP).....	123
5.8.2	Luziferase-Experiment.....	125
6	Abkürzungsverzeichnis.....	126
7	Literatur.....	128
8	Anhang.....	137

1 Zusammenfassung

In Genexpressionsanalysen von embryonalen murinen Fibroblastenzellen, die beide durch die t(4;11)-Translokation hervorgerufenen Fusionsgene regulierbar exprimierten, konnte eine verstärkte Expression des embryonalen Stammzellfaktors Nanog gemessen werden. Nanog ist normalerweise in die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und des Selbsterneuerungspotentials von ES-Zellen involviert. Dieser Stammzellfaktor wurde bislang nur in embryonalen Stammzellen, embryonalen Karzinomazellen und in einigen weiteren Tumorarten in den so genannten Krebsstammzellen detektiert. In allen anderen Tumorarten, unter anderem in der durch t(4;11) hervorgerufenen akuten lymphatischen Leukämie wurde dieser Faktor bislang nicht nachgewiesen.

Aus diesen Resultaten konnte daher geschlossen werden, dass die beiden Fusionsproteine und das Nanog womöglich die Onkogenität der akuten lymphatischen Leukämie induzieren oder fördern.

Die Problematik bei der *NANOG*-Analyse im humanen System bestand bisher jedoch darin, zwischen dem tatsächlichen *NANOG*-Gen und seinen Pseudo-/Retrogenen zu unterscheiden. Die Transkripte einiger dieser Pseudo-/Retrogene und des Genduplikats *NANOG2* wurden bereits in Tumoren detektiert, wobei nur das Genduplikat *NANOG2* und das Retrogen *NANOGP8* für funktionelle Proteine kodieren können. Ihre Funktion in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz oder der Selbstaufrechterhaltung wurde jedoch bislang als unwahrscheinlich angesehen.

Um die Theorie, dass *NANOG* in akuter lymphatischer Leukämie ebenfalls transkribiert wird, zu verifizieren, sollten humane Blutzellen aus t(4;11)-Patienten und t(4;11)-Zelllinien auf *NANOG*-Transkription überprüft werden. Mit Hilfe der RT-PCR-Experimente konnte zunächst gezeigt werden, dass *NANOG*-Transkripte und die Transkripte seiner Targetgene tatsächlich in diesen Zellen vorliegen und die Zellen somit tatsächlich durch Stammzellfaktoren reguliert werden. Nach einer genaueren Untersuchung wurden die *NANOG*-Transkripte als *NANOG2*-Amplifikate identifiziert. Zur Unterscheidung zwischen dem in der Literatur als *NANOG* bezeichnetem Gen und seinem Genduplikat wurde das Genduplikat als *NANOG2* und das bisher beschriebene Gen als *NANOG1* bezeichnet.

Weitere parallel durchgeführten Experimente zur Charakterisierung der *NANOG2*-Genstruktur ergaben, dass sowohl das *NANOG2*-Gen als auch das *NANOG1*-Gen weitere neue Exons für ihre Transkription benutzen, die eine Vielzahl von Spleißvarianten und 5 Proteinvarianten kodieren. Mit Hilfe dieser Experimente konnten zum ersten Mal Oligonukleotide zur Unterscheidung der *NANOG1*-, *NANOG2*- und der Pseudo-/Retrogene erstellt werden. Außerdem ließen sich die regulatorischen Regionen und die Promotoren beider Gene mit Hilfe der Reportergenexperimente und der ChIP-Experimente datieren. Den Ergebnissen zufolge werden beide Gene jeweils durch zwei Promotoren reguliert.

Um die Eigenschaften des *NANOG2*-Proteins auf die Leukämieentstehung zu untersuchen, wurden zusätzlich stabile HEK-293wt-Zelllinien etabliert, die verschiedene *NANOG1*- bzw. *NANOG2*-Proteinvarianten exprimierten. Zunächst wurde durch immunohistologische Experimente gezeigt, dass alle *NANOG2*-Proteine wie das *NANOG1*-Protein tatsächlich in den Kern translozieren und somit die Funktion des *NANOG1*-Proteins übernehmen könnten. Mit Hilfe von Genexpressionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass *NANOG1*- und *NANOG2*-Protein funktionell äquivalent sind und bestimmte Zielgene in gleicher Weise regulieren. Eines dieser hochregulierten Gene kodiert für den Stammzellfaktor DNMT3B, der für die Embryogenese entscheidend ist und normalerweise nur in Stammzellen transkribiert wird. Das Gen war interessanterweise ebenfalls in AML-Patienten aber nicht in gesunden Probanden transkriptionell aktiv. Ein weiteres wichtiges Gen war *EGR1*, dass den für Stammzellen so wichtigen Faktor p21 transkriptionell reguliert

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal gezeigt werden, dass *NANOG2* in Leukämiepatienten tatsächlich transkribiert wird und vermutlich an der Etablierung der Stammzell-ähnlichen Eigenschaft beteiligt ist, denn der Faktor konnte wie *NANOG1* gleiche Gene induzieren, die für Stammzellaufrechterhaltung und Zellteilung entscheidend sind. Parallel wurde sowohl die *NANOG1*- als auch die *NANOG2*-Genstruktur neu definiert, wodurch eine Vielzahl unterschiedlicher Spleiß- und Proteinvarianten entdeckt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *NANOG2* ebenfalls in hämatopoetischen Zellen transkriptionell aktiv ist und dadurch einen neuen Surrogatfaktor für Stammzellen darstellt.

2 Einleitung

2.1 Definition von Stammzellen

2.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus dem präimplantaren Embryonen isoliert. Die Zellen werden pluripotent bezeichnet, da sie in alle drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) differenzieren können, und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben (Martin, 1981). Charakteristisch weisen die Zellen eine zellspezifische Anreicherung von aktiven Genen auf, die in anderen Zelltypen nur schwach oder gar nicht zu beobachten ist. Diese Gene werden als embryonale Stammzellmarkergene bezeichnet (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Einige dieser Gene kodieren für Proteine, die als die Regulatoren der Selbsterneuerung und der Pluripotenz angesehen werden (Scholer *et al.*, 1989; Sutton *et al.*, 1996; Avilion *et al.*, 2003). Sobald die Differenzierung der ES-Zellen jedoch einsetzt, verschwindet die Genexpression dieser Gene und andere, für die Differenzierung wichtigen Gene, werden angeschaltet. Einer der Faktoren, der die Stammzellpluripotenz aufrechterhält, ist das NANOG-Protein (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003; Booth and Holland, 2004).

2.1.2 Gewebespezifische Stammzellen

Während der Entwicklung der Organe eines Embryos entstehen organspezifische Stamm- oder Vorläuferzellen. Diese behalten zwar die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bei, verfügen aber über keine Pluripotenz mehr. Sie weisen bereits Merkmale des zugehörigen Gewebes auf und halten die Zellanzahl des Gewebes konstant, indem sie sich mitotisch vervielfältigen. Nach der Zellteilung differenzieren die neuen Zellen zu den spezifischen Gewebezellen, die selbst ein stark eingeschränktes Proliferationspotenzial besitzen. Die Eigenschaft der organspezifischen Stammzellen, nämlich alle Zellen eines Gewebes zu bilden, wird multipotent genannt.

Eine der grundlegenden Fragen ist, ob die embryonalen und die gewebespezifischen Stammzellen durch gleiche Faktoren reguliert werden. Durch den Vergleich aktiver Gene von humanen und murinen ES-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen konnte die

Expression einiger Gene in beiden Zelltypen nachgewiesen werden (Boyer *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Die meisten gemeinsamen Gene sind wichtig für den Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und Chromatinmodifikation mit DNA-Methylasen, Histondeacetylasen und SNF2/SW12 Helikasen.

Bemerkenswert ist, dass viele dieser Gene nicht nur exklusiv in Stammzellen exprimiert werden. Vermutlich ist ihre Zusammensetzung für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters entscheidend (Ramalho-Santos *et al.*, 2002).

Die Transkription einiger Gene bleibt aber nur auf gewebespezifische Stammzellen beschränkt. Viele dieser Gene sind für die Differenzierung notwendig, wie zum Beispiel die Hox-Gene (Wong *et al.*, 2008).

Die Expression mehrerer Gene, die ES-spezifisch sind und in gewebespezifischen Stammzellen nicht gefunden werden, könnten unterschiedliche Erklärungen haben. Die Gründe dafür könnten einerseits die Reprimierung der Gene in gewebespezifischen Stammzellen sein, andererseits sind die Ansätze von unterschiedlichen Versuchen nicht vergleichbar und können zu abweichenden Ergebnissen geführt haben. Während die Studie von Boyer *et al.* alle Promotoren, die von Stammzellfaktoren NANOG, OCT4 und SOX2 in ES-Zellen gebunden werden, mit einem ChIP-Assay untersuchte, stellten die Gruppen Ivanova *et al.* und Ramalho-Santos *et al.* Genexpressionsanalysen zur Identifizierung der Stammzellfaktoren in embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen auf. Dabei waren in jeder Studie andere Gene auf dem Microarray-ChIP aufgebracht worden. Ein zweites Problem dieser Analyse ist, dass viele der im Microarray analysierten Transkripte in der Zelle nicht translatiert werden und aus diesem Grund nicht als stammzellspezifische Faktoren angesehen werden dürfen (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Nichtsdestotrotz wurden bereits hämatopoetische Stammzellen, also gewebespezifische Stammzellen in eine Maus intravenös transplantiert, welche sich in einzelnen Organen etablierten und Funktionen übernahmen (Krause *et al.*, 2001). Somit scheinen auch gewebespezifische Stammzellen die Fähigkeit zur Differenzierung in ein anderes Gewebe zu besitzen.

Eine andere Studie besagt, dass die ES-Zellen nicht mit allen gewebespezifischen Stammzellen verglichen werden können (Wong *et al.*, 2008).

Die Studie von Wong *et al.*, in der viele der unterschiedlichen Expressionsanalysen miteinander verglichen wurden, stellte fest, dass gewebespezifische Stammzellen einiger weniger Gewebe ein ES-ähnliches Programm aktivieren und die Mehrheit der unterschiedlichen gewebespezifischen Stammzellen jedoch ein adultes Stammzellprogramm induzieren. Das ES-ähnliche Programm weist Gene auf, die auch in ES-Zellen aktiv sind, während das adulte Stammzellprogramm nur die in Gewbestammzellen aktiven Gene enthält. Zu den Zellen, die das ES-ähnliche Programm aktivieren, zählen die hämatopoetischen Stammzellen aus der fötalen Leber und die neuronalen Stammzellen. Die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark scheinen nur das adulte Stammzellprogramm zu aktivieren.

Nach Angabe von Wong *et al.* konnten in beiden Programmen die für die Pluripotenz notwendigen Faktoren OCT4 und NANOG in den gewebespezifischen Stammzellen nicht detektiert werden. Diese sind spezifisch auf embryonale Stammzellen beschränkt (Wong *et al.*, 2008). Einige Studien konnten jedoch eine schwache Expression von OCT4 und einem anderen ES-spezifischen Gen, Dppa3 in den im Knochenmark vorliegenden Stammzellen und im peripheren Blut zeigen (Elliman *et al.*, 2006; Pochampally *et al.*, 2004; Zangrossi *et al.*, 2007).

2.1.3 Hämatopoetische Stammzellen

Das am stärksten sich regenerierende Organ ist das Blut (Rieger and Schroeder, 2003). Für die Neubildung der Zellen sind hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen vor allem im Knochenmark verantwortlich. Die hämatopoetischen Stammzellen machen zwar nur eine Zelle von 100.000 Knochenmarkzellen aus, ist aber bei der täglichen Bildung von 2×10^{11} Erythrozyten und 10^{10} Leukozyten beteiligt (Rieger and Schroeder, 2003). Die Stammzelle teilt sich nur langsam und bildet sogenannte Vorläuferzellen aus, die etwas schneller proliferieren und zu den gewebespezifischen Zellen differenzieren. Anhand der Rezeptoren lassen sich die unterschiedlichen Zellen eines Gewebes unterscheiden. In der Maus können mithilfe des Stammzellfaktorrezeptors c-kit und des Stammzellantigens-1 (Sca-1) Stammzellen von Vorläuferzellen abgegrenzt werden. Die unreifsten Stammzellen, die etwa 50 % der Stammzellen ausmachen, lassen sich durch die Abwesenheit des Oberflächenmarkers CD34 von bereits weiterentwickelten

Stammzellen mit eingeschränkter Selbsterneuerungskapazität unterscheiden (Osawa *et al.*, 1996). Im humanen System lassen sich die humanen Stammzellen kontrovers zum vorherigen aufgrund des Zelloberflächenmarkers CD34⁺ aufreinigen, wobei die Population aus hämatopoetischen Stammzellen und aus Vorläuferzellen besteht.

Die meisten hämatopoetischen Stammzellen befinden sich im Knochenmark, ein gewisser Teil befindet sich aber auch im Nabelschnurblut, der adulten Leber und im peripheren Blut (Rodewald and Friedrich, 2002).

2.1.4 Krebsstammzellen

Eine der bedeutendsten Fragen in der Krebsforschung ist, ob die Tumorbildung von bestimmten Zellen, die Stammzeleigenschaften aufweisen, induziert wird.

Zur Herkunft der Krebszellen wurden zwei Theorien aufgestellt. Die erste Theorie besagt, dass Tumorzellen in humanen Leukämien und soliden Tumoren aus einer kleinen Population von unreifen Krebsstammzellen hervorgehen (Wang and Dick, 2005; Kennedy *et al.*, 2007). Wie bei einer normalen Hämatopoese produzieren die Krebsstammzellen Vorläuferzellen, die sich weiter teilen und zur Tumormasse differenzieren.

Die Krebsstammzellen entstehen vermutlich direkt aus Stammzellen oder Vorläuferzellen, die noch Stammzellcharakter mit Selbsterneuerungseigenschaften aufweisen. Diese Zellen verweilen nämlich am längsten im Organismus und sind häufiger Mutationen ausgesetzt, die häufig der Grund für die Tumorbildung sind (Rieger and Schroeder, 2003; Bonnet and Dick, 1997; Dick, 2003).

Die Existenz von Leukämienstammzellen konnte von Bonnet und Dick, 1997 nachgewiesen werden, nachdem sie Blutproben aus einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) in Mäuse transplantiert haben und bei diesen Mäusen ebenfalls Leukämien hervorriefen. Nach der Isolierung der Leukämienstammzellen (CD34⁺-Zellen) und die anschließende Transplantation in Mäuse wurde die Vermutung bestätigt, dass die Zellen wie hämatopoetischen Stammzellen sich selbst erneuern können. Differenzierte Zellen waren zu dieser Eigenschaft nicht fähig.

Weitere Studien über die Identifizierung von Leukämienstammzellen in akuten und chronischen myeloischen Leukämien zeigten, dass die Leukämienstammzellen viele

phänotypische und funktionelle Eigenschaften mit hämatopoetischen Stammzellen teilen (Bonnet and Dick, 1997; Hope *et al.*, 2004). Alle Zellen zeigen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung, eine Resistenz gegenüber Apoptose und ein unlimitiertes Proliferationspotenzial.

Gleichzeitig konnte durch den Vergleich vieler Genexpressionsanalysen aus unterschiedlichen Studien ein ES-ähnliches Programm in vielen humanen Krebsarten festgestellt werden (Wong *et al.*, 2008). Interessanterweise zeigten Patienten mit Tumoren, unter anderem Leukämien, in denen das ES-ähnliche Programm aktiv war, eine geringe Überlebensrate (Wong *et al.*, 2008; Somerville *et al.*, 2009; Chiou *et al.*, 2008). Eine kleine Population von Krebsstammzellen konnte auch in Brustkrebs und Gehirntumoren identifiziert werden. Während die größte Tumormasse keine Krebsaktivität zeigte, konnten die Krebsstammzellen eine Tumorbildung initiieren (Al-Hajj *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004).

Die zweite Theorie besagt, dass die Mehrheit der bösartigen Zellen Stammzeleigenschaften hat (Le Viseur *et al.*, 2008). B-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer akuten lymphatischen Leukämie wurden nach ihren unterschiedlichen Reifezuständen aufgetrennt und in SCID-Mäuse transplantiert. Alle Zelltypen konnten in den Mäusen eine Leukämie hervorrufen. Für die Auftrennung der Zellen wurden die Zelloberflächenmarker CD19, CD20 und CD34 benutzt. Während der Marker CD34 für die Identifikation von hämatopoetischen Stammzellen benutzt wird, stehen die Marker CD19 und CD20 für B-Vorläuferzellen. Etwa 85 % dieser gereinigten Zellen waren zu Leukämiezellen konvertiert. Gleichzeitig geht die Gruppe davon aus, dass die Zellen in einer akuten Leukämie unabhängig von ihrem Reifegrad ineinander übergehen können und jede Zelle sowohl eine unreife CD34-positive als auch eine reifere CD19-positive B-Zelle bilden kann. Der Grundsatz dieser Thesen ist, dass jede Leukämiezelle unterschiedlichen Grades die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Aktivierung der Selbsterneuerungsmaschinerie besitzt. Die Selbsterneuerung wird vermutlich durch Mutationen eingeleitet (Dick, 2005).

Aber nur die CD34-positiven leukämischen Stammzellen sind vermutlich die gefährlichsten Zellen. Sie weisen viele Transporter auf, die die Zellen von Toxinen

säubert und ihnen Therapieresistenz verleiht (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Selbst wenn die B-Vorläuferzellen ebenfalls über eine Selbsterneuerungsfähigkeit verfügen, könnten die CD34-positiven Leukämienstammzellen eine Quelle von Arzneistoff-resistenten Zellen bilden, die im Gegensatz zu den reiferen Zellen sowohl Chemotherapie als auch andere Behandlungen überleben und somit eine gefährlichere Zellgruppe darstellen (Le Viseur *et al.*, 2008).

2.1.5 Gemeinsame Eigenschaften der Stammzellen

Eine der Charakteristika für Stammzellen sind Chromatinveränderungen in der Zelle. Das Chromatin ist eine Form der DNA, die mit basischen Histonen besetzt ist. Unter anderem durch die Histone wird die Erbsubstanz zum locker verpackten Euchromatin oder dem eng verpackten Heterochromatin kondensiert. Für die Gentranskription muss das Chromatin locker verpackt sein, um die Interaktion der Transkriptionsproteine mit den DNA-Bindedomänen zu ermöglichen. In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass die Transkription sowohl durch die Histon- als auch durch die DNA-Modifikationen entscheidend reguliert wird. Eine Reihe von Enzymen acetyliert Lysinreste der N-Termini von Histonproteinen, wodurch die Assoziation der Proteine mit der DNA herabgesetzt wird und die Transkriptionsmaschinerie einen besseren Zugang zu der DNA findet. Außerdem können bestimmte Lysinreste der Histone dreifach methyliert sein (Sarg *et al.*, 2004), wodurch es entweder zu einer Reprimierung oder zu einer Aktivierung der Genexpression kommen kann. Während Tri-Methylierungen am Lysinrest 4 vom Histon 3 (H3K4) immer für Aktivierungen verantwortlich sind, reprimieren Tri-Methylierungen von Lysinresten 9 oder 27 am Histon 3 (H3K9 oder H3K27) die Genexpression.

Weitere entscheidende Chromatinveränderungen werden durch die Modifikation der DNA verursacht. Diese wird an C- und G-reichen Sequenzabschnitten (CpG-Inseln) stark methyliert, was zu einer Kondensierung der DNA und folglich zu einer Genexpressionsreprimierung führt.

Oft werden solche Modifikationen an den Telomeren, Centromeren oder am inaktivierten X-Chromosom gefunden.

Die Chromatinumgestaltung spielt eine wichtige Rolle während der epigenetischen Reprogrammierung. Zweimal in der Entwicklung des Embryos wird die DNA durch die sogenannten DNA-Demethylasen demethyliert und die epigenetischen Markierungen werden erodiert. Die erste genomweite Demethylierung erfolgt kurz nach der Fertilisation einer Eizelle und die zweite Demethylierungswelle läuft in Vorläuferkeimzellen ab. Die Demethylierung dekondensiert das Chromatin und ermöglicht die Transkription sehr vieler Gene.

Die Demethylierung und die Veränderung des Chromatins bezeichnet man als Erodierung der epigenetischen Information (Szabo *et al.*, 2002). Durch die Erodierung können Gene aktiviert werden, die vermutlich für die Selbsterneuerung erforderlich sind. Es ist möglich, dass dadurch die Reaktivierung der Faktoren OCT4, NANOG und SOX2 erfolgt (Reik *et al.*, 2001). Anschließend müssen die Markierungen erneut gesetzt werden. Dieser Vorgang wird als Reprogrammierung bezeichnet. Dabei werden Histone und Methylierungen durch die Methyltransferasen DNMT und die Proteine der Chromatingestaltungs-komplexe wieder angelegt, um die Genexpression vieler Gene besser zu regulieren und ein Transkriptionsprofil zu etablieren.

In hämatopoetischen oder gewebespezifischen Stammzellen wurden bisher keine Erodierungen beschrieben, aber in Krebszellen wurde eine genomweite Demethylierung beobachtet (Feinberg *et al.*, 1988).

2.1.5.1 DNA-Methylierung durch DNMT3A/B

Für die normale Zellentwicklung müssen die Methylierungen erneut gesetzt werden. Die Methylierungsreaktion wird unter anderem durch die DNMT-Enzyme katalysiert (Bestor *et al.*, 1988). Die DNMT3A/B werden primär in Keimzellen exprimiert (Sakai *et al.*, 2004). Außerdem fungiert DNMT3B als ein wichtiger Regulator in der frühen Embryogenese, speziell in der inneren Zellmasse und dem embryonalen Ektoderm (Sperger *et al.*, 2003). In ES-Zellen, die ursprünglich aus der inneren Zellmasse entnommen wurden, ist DNMT3B hochreguliert (Ivanova *et al.*, 2002, Sperger *et al.*, 2003). Auch der Genexpressionsvergleich von 59 humanen ES-Zelllinien identifizierte DNMT3B neben NANOG und OCT4 als einen gemeinsam von allen Zelllinien exprimierten Faktor. Gleichzeitig konnte eine Korrelation zwischen NANOG und

DNMT3B beobachtet werden. Bei Hochregulierung von NANOG wurde ebenfalls eine erhöhte DNMT3B-Expression detektiert. Diese Korrelation war zum Beispiel bei NANOG und SOX2 nicht gegenwärtig, obwohl SOX2 ein Targetgen von NANOG ist (Stem Cell initiative, 2007).

Die verstärkte Expression von der Methyltransferase DNMT3A wurde bisher nur in hämatopoetischen Stammzellen beobachtet (Ivanova *et al.*, 2002).

Die Methyltransferasen werden nicht nur in ES-Zellen hochreguliert. Es konnte auch ein erhöhtes Expressionslevel an DNA-Methyltransferasen in Tumoren nachgewiesen werden (Kautiainen and Jones, 1986; El-Deiry *et al.*, 1991).

Bisher ist die Diskrepanz zwischen genomweiter Demethylierung und gleichzeitiger verstärkter Expression von DNA-Methyltransferasen wie DNMT in ES-Zellen und Tumoren nicht erklärt worden.

Es konnten aber bereits mehrere Zusammenhänge zwischen Promotor-Methylierungen von Tumorsuppressorgenen und der Krebsentwicklung gezeigt werden (Jurgens *et al.*, 1996). Die Hypermethylierung von Tumor-Suppressoren ist eines der epigenetisch wirkenden Mechanismen in Krebszellen zur Aufrechterhaltung der Onkogenese (Laird and Jaenisch, 1996). In einigen Tumorzelllinien wurde eine CpG-Hypermethylierung der Promotoren von den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p16 und p15 beobachtet, die den Zellzyklus und damit die Zellproliferation regulieren (Gonzalez-Zuleta *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1996). Durch die Methylierung und die daraus resultierende Reprimierung der Genexpression konnte die Zellproliferation nicht gestoppt werden. Die Methyltransferasen in Tumoren scheinen demnach die Proliferation durch die Inhibition wichtiger Tumorsuppressorgene zu fördern.

2.2 NANOG-Expression

Ein für die Stammzellforschung interessanter Faktor ist NANOG, da er für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters notwendig ist.

NANOG wurde bisher nur im Säuger genom gefunden. Die Identifikation erfolgte zunächst in Mäusen, deren ES-Zellen aufgrund der Nanog-Deletion die Charakteristika der ES-Zellen verloren (Chambers *et al.*, Mitsui *et al.*, 2003). Eine Nanog-Überexpression macht murine ES-Zellen unabhängig vom LIF-STAT3-Weg. Der LIF-STAT3-Weg musste bisher zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung *in vitro* angewandt werden (Williams *et al.*, 1988). Hyslop *et al.* und Mitsui *et al.* zeigten, dass bei einer Herunterregulierung der Nanog-Transkription in murinen ES-Zellen diese zum extraembryonalen Endoderm differenzierten und eine vollkommene Gendeletion im Embryo zu einer embryonalen Lethalität führte (Hyslop *et al.*, 2005, Mitsui *et al.*, 2003). Außerdem konnte Darr *et al.* zeigen, dass die NANOG-Überexpression in humanen ES-Zellen eine Kultivierung ohne die für die Pluripotenz wichtigen Feeder-Zellen ermöglicht (Darr *et al.*, 2006). Diese Entdeckung ließ zum ersten Mal humane ES-Zellen ohne die Hilfe von Feeder-Zellen kontinuierlich kultivieren, wobei die Zellen nicht wie bisher differenzierten oder die grundlegenden embryonalen Fähigkeiten (die Pluripotenz und die Selbsterneuerung) verloren.

Gleichzeitig zeigten humane somatische Zellen mit einer Überexpression der Gene NANOG, OCT4, SOX2 und LIN28 ein ES-ähnliches Zellverhalten (Yu *et al.*, 2007). Die vorher differenzierten Zellen fingen an, Oberflächenmarker der Stammzellen zu produzieren und wiesen viele der für ES-Zellen typischen Genexpressionen auf. Außerdem waren sie pluripotent, da sie nach dem Einsetzen der Differenzierung in alle drei Keimblätter differenzierten.

Das murine Nanog wird in den inneren Zellen der Morula und der Blastocyste gebildet. Das humane Pendant dazu wurde in der inneren Zellmasse von der Blastocyste gefunden (siehe Abb. 2.1). Die Zellen der inneren Zellmasse sind im Gegensatz zu den Trophoblastenzellen pluripotent und bilden nach der Implantation den Embryo aus. Diese Zellen werden auch als embryonale Stammzellen (ES) bezeichnet.

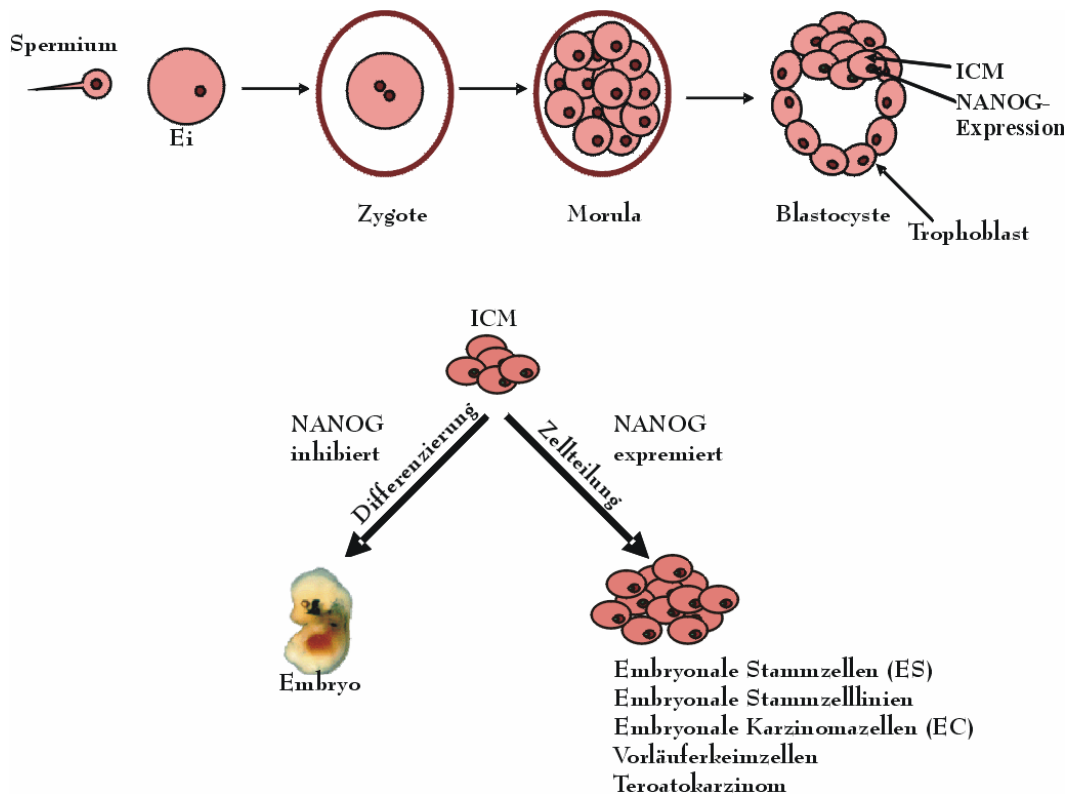


Abb. 2.1: NANOG-Expression im Verlauf der embryonalen Entwicklung

Die Fusion des Spermiums mit der Eizelle bildet zunächst eine Zygote, die sich vielfach teilt. Die sich ausbildenden Zellen bilden zunächst die Morula und später die Blastocyste. Nur die Zellen der inneren Zellmasse in der Blastocyste entwickeln sich zum Embryo. Im Blastocystenstadium produzieren die Zellen der inneren Zellmasse das Protein NANOG. Mit einer fortführenden NANOG-Expression erneuern sich die Zellen unlimited. Dies ist bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), embryonalen Stammzelllinien, embryonalen Karzinomazellen (EC-Zellen), Vorläuferzellen und Teratokarzinomazellen der Fall. Sobald die Zellen sich jedoch differenzieren, nimmt die NANOG-Expression ab.

Sobald die Differenzierung der pluripotenten Zellen einsetzt, wird keine NANOG-Expression mehr nachgewiesen. Eine erneute Transkription erfolgt während der Embryogenese in den Vorläuferkeimzellen.

Oft weisen die Vorläuferkeimzellen Fehlfunktionen bei ihrer Entwicklung auf und bilden Keimzelltumore. Ein spezieller Typ der Keimzelltumore ist das Teratokarzinom, welches noch undifferenzierte Krebsstammzellen enthält, die als embryonale Karzinomazellen (EC) bezeichnet werden (Sperger *et al.*, 2003). In ihnen konnte ebenfalls die *NANOG*-Transkription detektiert werden (Hyslop *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2004). Auch andere Keimzelltumore, die in die Kategorie Seminomas eingeteilt werden, exprimieren embryonale Zelloberflächenstammzellmarker (Clark, 2007). Alle hier angesprochenen

Krebsarten weisen Stammzellcharakteristika auf, die sie mit den ES-Zellen teilen (Clark, 2007). Sie exprimieren verstärkt zum Beispiel die für die Pluripotenz notwendigen Transkriptionsfaktoren NANOG und OCT4. Auffällig ist, dass die NANOG-Expression bisher nur auf ES-Zellen oder auf Krebsstammzellen beschränkt war. Es konnte bis vor kurzem keine NANOG-Expression in adulten Geweben, gewebespezifischen Stammzellen oder anderen als den oben angesprochenen Tumorarten gezeigt werden (Chambers *et al.*, 2003; Ramalho-Santos *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu *NANOG* sind Transkripte von *OCT4* und seiner Pseudogene auch in humanen gewebespezifischen Stammzellen wie Knochenmarkstammzellen und in humanen Tumorgeweben ohne Krebsstammzellen bereits detektiert worden (Monk and Holding, 2001; Suo *et al.*, 2005).

Der erste Hinweis auf Nanog-Expression in differenzierten murinen Zellen, die keine Krebsstammzellen vorweisen, wurde mittels eines Genexpressionsassays erbracht (Gaussmann *et al.*, 2007). Murine Fibroblastenzellen (MEF), in denen die Fusionsproteine der t(4;11)-Translokation überexprimiert wurden, zeigten eine Nanog-Reaktivierung.

Zur gleicher Zeit wurden *NANOG*- und *OCT4*-Transkripte auch in Brustkrebsstammzellen und daraufhin in Plattenepithelkarzinomazellen detektiert (Chiou *et al.*, 2008; Ezech *et al.*, 2005). Bemerkenswert war, dass die Tumore, in denen NANOG- und OCT4-Expression detektiert wurde, alle eine sehr schlechte Überlebensrate hatten.

Interessanterweise sind die Gene von *NANOG* und *OCT4* oft in Krebsstammzellen aktiv. Eine erhöhte oder unnormale Expression von NANOG in Stammzellen oder Tumorgeweben könnte demnach eine entscheidende Rolle in Tumortransformation oder Tumormetastasierung spielen. Studien mit pluripotenten Zellen, die in Mäuse transplantiert wurden, zeigten, dass diese Mäuse Tumore entwickelten. Wie auch die pluripotenten Zellen waren die Tumorzellen häufig unsterblich und invasiv, was folglich zur Metastasierung führte. In einer dieser Studien wurde beobachtet, dass die ektopische Überexpression des murinen Nanog in der murinen hämatopoetischen Zelle eine Leukämie in den Mäusen hervorrief. Die Nanog-Überexpression störte sowohl die Entwicklung weiterer Blutzellen als auch die Aufrechterhaltung der Thymusumgebung. Der Thymus wurde zunehmend von T-Zellen überschwemmt, die Nanog

überexprimierten, so dass normale T-Zellen nicht mehr entstehen konnten und diese atrophierte. Außerdem wurden weitere T-Zellen, die Nanog überexprimierten auch außerhalb des Thymus entdeckt. Sie waren demnach für Migration fähig, was eine Voraussetzung für Metastasierung ist (Tanaka *et al.*, 2007).

Eine weitere, die These unterstützende Beobachtung, dass die Tumortransformation teilweise auf NANOG-Überexpression zurückzuführen ist, ist die Vervielfältigung des Chromosoms 12p in einigen Seminomas und Teratokarzinomas (van Echten *et al.*, 1997). Dieses Chromosom trägt das *NANOG*-Gen und es könnte durch die Chromosomvervielfältigung zu einer gesteigerten NANOG-Expression und somit zur Tumorausbildung führen.

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die invasiven Tumore, in denen keine Krebsstammzellen identifiziert worden sind, aber *NANOG*-Transkription nachgewiesen wurde, durch die Dedifferenzierung einer adulten Zelle oder aus einer unnormalen Stammzelle hervorgehen. Erfolgt eine Dedifferenzierung einer adulten Zelle, so könnte dies zur Initiation der *NANOG*-Transkription führen, was eine Basis für Selbsterneuerung ist. Viele der Tumore könnten aber auch Krebsstammzellen enthalten, die *NANOG* überdurchschnittlich exprimieren. Da die Krebsstammzellen nur eine kleine Population des Tumors darstellen und keine einheitlichen Merkmale aufweisen, ist es sehr schwer diese zu identifizieren und zu isolieren.

2.3 Genregulation

2.3.1 Murine Regulation

Die Regulation der *Nanog*-Transkription konnte mittlerweile ausführlich für die murinen ES-Zellen beschrieben werden. Die Analyse des 5' Promotors von dem Gen offenbarte einige Bindedomänen für aktivierende und auch reprimierende Faktoren, die zwischen 180 kbp und 5 kbp vor dem Transkriptionsstartpunkt von *Nanog* binden. Zu den Vertretern der positiven Regulation gehören Stat3, T (Brachyury), FoxD3, Sall4 und Nanog selber (Suzuki *et al.*, 2006; Loh *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2006). Sie interagieren über den Mediatorkomplex mit der RNA Polymerase II und ermöglichen dadurch die Interaktion mit dem *Nanog*-Promotor. Zwei der wichtigsten aktivierenden

Faktoren sind Oct4 und Sox2 (Rodda *et al.*, 2005). Oct4 zählt zu den Schlüsselfaktoren der Stammzellaufrechterhaltung und wird genauso wie Nanog in ES-Zellen exprimiert (Niwa *et al.*, 2000). In Oct4^{-/-}-Zellen konnte zwar noch *Nanog* mRNA nachgewiesen werden, aber diese reicht nicht aus, um die Pluripotenz aufrechtzuerhalten (Chambers *et al.*, 2003).

Als Ersatz für Sox2 wurde der Komplex PSBP beschrieben, der mit Oct4 in ES-Zellen an die Promotorstelle bindet und das Gen aktivieren kann (Kuroda *et al.*, 2005).

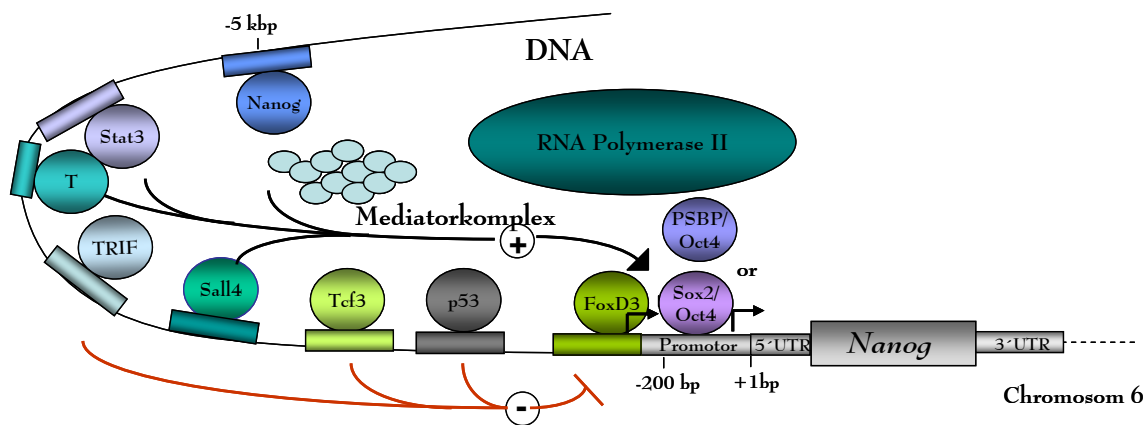


Abb. 2.2: *Nanog*-Genregulation in murinen ES-Zellen.

Das *Nanog*-Gen liegt auf dem Chromosom 6 und wird von Transkriptionsfaktoren sowohl positiv als auch negativ reguliert. Die positiv regulierenden Faktoren (+) ermöglichen über die Interaktion mit einem Mediator-Komplex die Anlagerung der RNA-Polymerase II an den Promotor des Gens und eine Aktivierung der Transkription. An den Promotor direkt, der etwa 200 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes (+1) sich befindet, bindet der heterogene Komplex Sox2/Oct4 oder PSBP/Oct4. Faktoren, die *Nanog* negativ regulieren, sind mit einem (-) Zeichen gekennzeichnet. **UTR:** untranslated region

Eine negative Regulation des Gens fördert die Differenzierung der ES-Zellen. Der Tumorsuppressor p53 bindet im phosphorylierten Zustand an *Nanog* und inhibiert seine Transkription (Lin *et al.*, 2005). Andere bisher beschriebene Faktoren für die Hemmung der Transkription sind Tcf3 (transcription factor 3) und der TRIF-Komplex (Pereira *et al.*, 2006). Der TRIF-Komplex hat den *orphan nuclear receptor* GCNF als Komponente, der nach einer Retinsäurebehandlung direkt an den *Oct4*- und *Nanog*-Promotor bindet. Der Rezeptor ermöglicht eine DNA-Methylierung wodurch die NuRD-Repressionskomponenten an das Gen rekrutiert werden (Gu *et al.*, 2008; Mullen *et al.*, 2007). Außerhalb von dem beschriebenen Bereich von 5 kbp konnten weitere DNase-

sensitive Stellen identifiziert werden, die als putative Bindedomänen für Regulatoren gelten. (Orkin *et al.*, 2008).

2.3.2 Humane Regulation

Über die Regulation des humanen *NANOG* ist weitaus weniger bekannt. Nichtsdestotrotz sind Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Gen entdeckt worden. Der entscheidende Unterschied ist die Rolle von LIF (Luekämie inhibierender Faktor), welches bei der murinen ES-Zelle benötigt wird. In humanen Stammzellen ermöglicht weder die Zugabe von LIF noch die Aktivierung von Stat3 die Aufrechterhaltung der Pluripotenz (Daheron *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2004).

Die Wirkungsweise vieler Regulatoren in murinen ES-Zellen konnten in den humanen ES-Zellen nicht bestätigt werden oder es wurde sogar eine gegensätzliche Funktion beschrieben. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von c-Myc in murinen ES-Zellen die Proliferation fördert und in humanen ES-Zellen zur Apoptose und Differenzierung führt (Sumi *et al.*, 2007).

Die Überprüfung der Targetgene zwischen dem murinen Nanog und dem humanen *NANOG* ergab außerdem eine Überlappung von nur 13 %. Das humane *NANOG*, welches nur 58 % Identität mit dem murinen Protein aufweist, konnte in murinen Zellen weniger effektiv die Selbsterneuerung aufrechterhalten (Chambers *et al.*, 2003; Darr *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

Bisherige Promotoranalysen am humanen *NANOG* ergaben eine Interaktionen der Transkriptionsfaktoren OCT4 und SOX2 mit dem proximalen Promotor (Kuroda *et al.*; 2005). Alle bisher beschriebenen Regulatoren von *NANOG* scheinen über OCT4 zu wirken. Über die Bindung des Regulators and den *OCT4*-Promotor und die darauf folgende OCT4-Expression und OCT4-Interaktion mit dem *NANOG*-Promotor wird das *NANOG*-Protein hergestellt. Zu den Regulatoren zählt zum Beispiel Tpt1. Dieser Faktor wurde in einem Gelshift-Assay identifiziert, in dem die *OCT4*-Promotorsequenz und der aus den *Xenopus* Oozyten isolierter Proteinextrakt verwendet wurde (Koziol *et al.*, 2007). Der Faktor bindet an den Promotor von *OCT4* und aktiviert das Gen. Nach dessen Expression konnte die *NANOG*-Expression aktiviert werden.

Ein weiterer Regulator ist NANOG selber. Es wurde eine Bindung von humanem NANOG an den eigenen Promotor und somit eine Autoregulation festgestellt (Boyer *et al.*, 2005). Es wurden zwei putative Binderegionen von NANOG beschrieben. Eine liegt direkt vor der 5'UTR und die zweite befindet sich etwa 1000 bp aufwärts vom Gen.

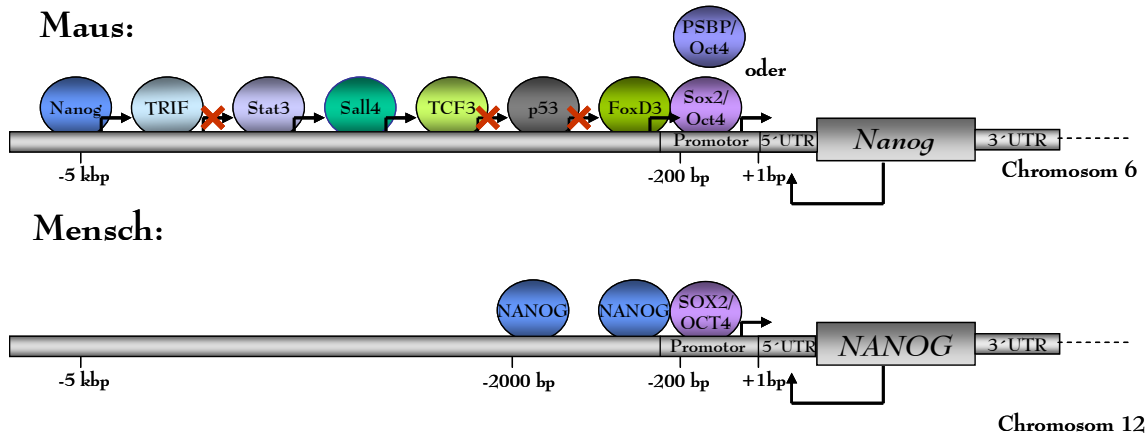


Abb. 2.3: NANOG-Genregulation in humanen embryonalen Stammzellen.

In der Abbildung werden die Chromosomabschnitte oberhalb von den *Nanog* / *NANOG*-Genen der murinen und humanen ES-Zellen verglichen. Über die Regulation des humanen *NANOG* ist nur wenig bekannt. Die einzigen bisherigen Regulatoren, die an den Promotor von *NANOG* binden, sind die Faktoren OCT4 und SOX2. Außerdem reguliert sich NANOG selber. **UTR:** untranslated region.

2.3.3 Epigenetische Regulation

Das Gen wird auch durch Histon- und DNA-Modifikationen reguliert. Es zeigte sich, dass die Histonacetyltransferase p300 die *Nanog*-Expression während der frühen Differenzierungsphase reguliert (Zhong and Jin, 2009). Der Faktor bindet an den distalen Promotor von murinem *Nanog* und reguliert die Expression vermutlich über eine Histonacetylierung oder eine Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor.

Im humanen Promotor von *NANOG* wurde neben der H3K4-tri-Methylierung, die für transkriptionsaktives Chromatin steht auch eine H3K9-Acetylierung zur Aktivierung des Gens beobachtet (Freberg *et al.*, 2007). Gleichzeitig nahm die Anzahl der H3K9 Tri- und Di-Methylierungen, die das Gen reprimieren, während der Genexpression ab.

In murinen ES-Zellen wurde ebenfalls eine Regulierung von *Nanog* durch H3K9-Methylierung beobachtet (Loh *et al.*, 2007). Es konnte eine Interaktion des murinen *Nanog*-Promotors mit der Demethylase Jmjd2c detektiert werden (Loh *et al.*, 2007). Diese ist für die Entfernung der Methylgruppen von H3K9 zuständig. Sobald die

Demethylase durch shRNA inaktiviert wurde, nahm die Chromatin-kondensierende tri-Methylierung von H3K9 am *Nanog*-Promotor zu und inhibierte die Expression des Gens. Außerdem konnte die H3K4-tri-Methylierung an allen intergenen regulatorischen Elementen vor *Nanog* (bis -151 kb vor dem Translationsstartpunkt) in *Nanog*-aktiven Zellen nachgewiesen werden. Diese Methylierung verschwand sobald die ES-Zellen zur Differenzierung angeregt wurden (Levasseur *et al.*, 2008).

In murinen somatischen Zellen, die mit ES-Zellen hybridisiert wurden, konnte epigenetische Modifikationen am Chromatin und die Aktivierung von *Nanog* festgestellt werden. Das reprogrammierte Genom wies vermehrt Hyperacetylierungen am 3. und 4 Histon und Methylierungen am H3K4 auf (Hatano *et al.*, 2005). Die somatischen epigenetischen Markierungen waren nicht mehr vorhanden. In einer Reprogrammierung müssten demnach die alten epigenetischen Markierungen erodiert und neue ES-Zell-spezifische Markierungen gesetzt worden sein.

Außer des Chromatins werden Genexpressionen über DNA-Methylierungen an den sogenannten CpG-Inseln reguliert. Die CpG-Inseln sind G- und C-reich und liegen häufig nahe zum Promotor. Über die Methylierung kann die Genexpression reguliert werden. Die CpG-Inseln sind bei reprimierten Genen starkt methyliert, wodurch eine Kondensierung des DNA-Abschnittes hervorgerufen wird (Antequera, 2003). In Studien mit murinem und humanem *NANOG* wurde demonstriert, dass der *NANOG*-Promotor nach der Pluripotenzetablierung in der Zelle an vielen CpG-Inseln demethyliert wurde (Blelloch *et al.*, 2006; Freberg *et al.*, 2007) Wenn die *NANOG*-Expression wieder abnahm, wurden die Promotoren von *NANOG* und *OCT4* hypermethyliert (Deb-Rinker *et al.*, 2005).

2.4 Genaufbau

Das auf dem Chromosom 12 liegende *NANOG*-Gen besteht aus vier Exons, die zusammen mit den Introns eine Länge von etwa 6 kbp einnehmen. Es wird als Homeoboxgen bezeichnet, da zwei der Exons für die konservierte Homeodomäne kodieren (Booth and Holland, 2004).

Der Promotor weist weder TATA- noch Sp1-Domänen auf. Es sind aber drei putative CAAT-Domänen vor der Transkriptionsinitiationsstelle vorhanden. Der Transkriptionsstartpunkt liegt direkt vor der OCT4-SOX2-Bindedomäne und etwa 216 bp vor dem ersten Exon (Booth and Holland, 2004). Die 5'UTR (untranslated region) ist demnach 216 bp groß. Die 3'UTR ist 983 bp und enthält ein Alu-Element.

Die Sequenz um den Translationsstartpunkt entspricht zu 60 % der Kozakkonsensussequenz, der Sequenz, die von der Translationsmaschinerie erkannt wird (Booth and Holland, 2004). Weitere Untersuchungen des *NANOG*-Transkripts ergaben noch weitere Sequenzen, die mit einer Ausnahme eine etwas niedrigere Abdeckung mit der Konsensussequenz haben. Sie liegen im ersten und zweiten Exon von *NANOG*. Eine der Sequenzen im zweiten Exon von *NANOG* entsprach aber zu 90 % der Kozakkonsensussequenz und wäre somit ein besserer Translationsstartpunkt als der bereits bekannte.

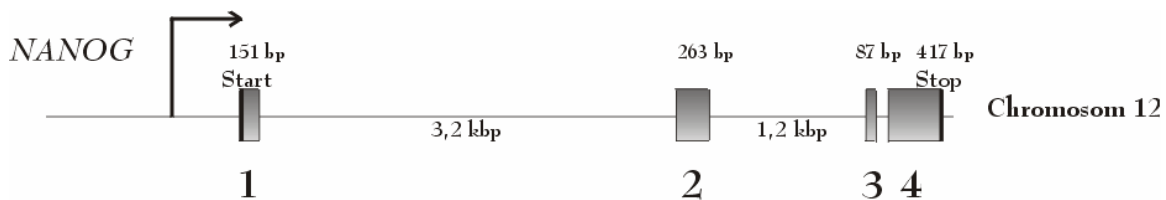


Abb. 2.4: Genaufbau von NANOG

Das Gen liegt auf Chromosom 12 und besteht aus vier Exons, die durch Introns getrennt sind. Die Größen (bp) der Exons/Introns sind jeweils über oder unter diesen markiert. Der Transkriptionsstartpunkt wird durch den Pfeil gekennzeichnet. Im Exon 1 und Exon 4 sind die Start- und Stop-kodierende Codons mit schwarzen Balken markiert.

Eine genaue Überprüfung des menschlichen Genoms auf *NANOG*-Homologien ergab, dass zehn prozessierte Pseudo/Retrogene und ein Duplikat von *NANOG* existieren (Booth and Holland, 2004).

2.4.1 Genduplikation, Pseudogene und Retrogene

Sowohl die Genduplikation als auch die Retrotransposition, die Pseudogene oder Retrogene hervorruft, tritt gehäuft in ES-Zellen auf (Goncalves *et al.*, 2000, Booth and Holland, 2004). Die Retrotransposition von ES-spezifischen Genen scheint bevorzugt zu werden, denn von drei Genen, die nur in pluripotenten Zellen transkribiert wurden, konnten 32 Pseudogene identifiziert werden. Im Gegensatz dazu hatte nur ein Gen von

den 15 untersuchten ES-nichtspezifischen Genen ein Pseudogen (Pain *et al.*, 2005). Die Vervielfältigung des Gens hängt oft mit der gehäuften Transkription des Gens aber auch mit der stark erhöhten Aktivität der reversen Transkriptase in ES-Zellen zusammen. Denn je häufiger ein Gen transkribiert wird, desto wahrscheinlicher wird das Transkript von der reversen Transkriptase zu einer cDNA konvertiert. Die cDNA wird daraufhin in anderen Chromosomen oder Genomabschnitten zufällig eingebaut. Diese Kopie enthält keine Introns und kann zumeist nicht transkribiert werden. Man spricht von einem Pseudogen. Diese Art von Genen produzieren keine funktionalen Proteine und werden als Genmüll definiert.

Wird die cDNA jedoch in die Nähe eines Promotors inseriert, kann eine Transkription erfolgen. Das beschriebene Gen wird folglich Retrogen genannt.

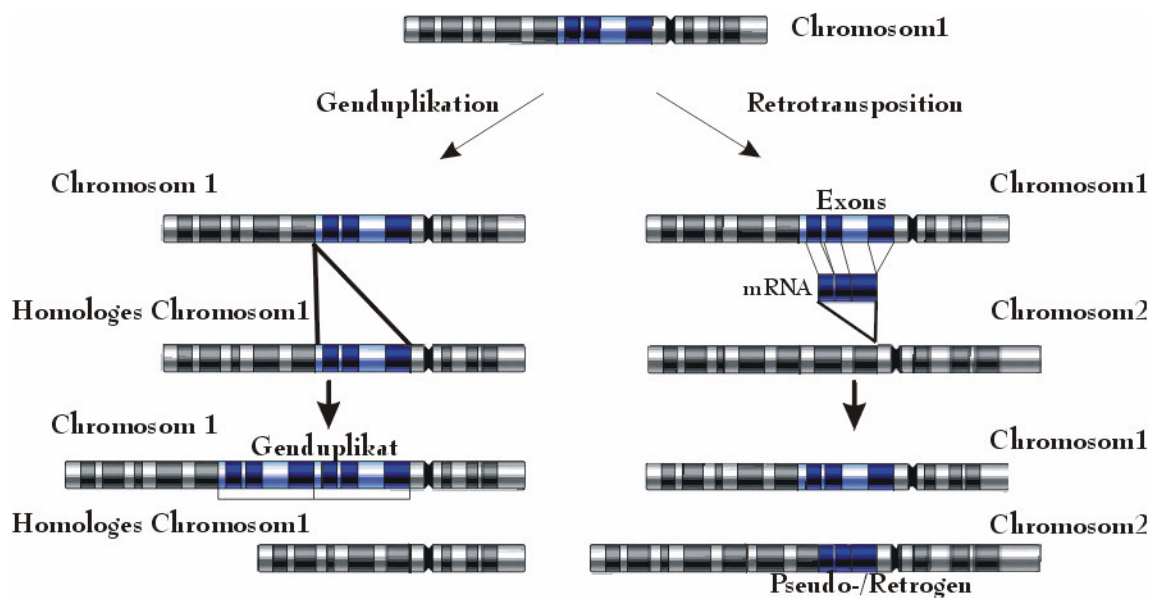


Abb. 2.5: Entstehung der Pseudo-/Retrogene und der Genduplikation.

Bei der sogenannten Retrotransposition entstehen die Pseudo-/Retrogene. Die mit dunkelblau markierten Exons werden transkribiert und die dabei entstehende mRNA wird über die Reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt und in ein anderes Chromosom inseriert. Bei einer Genduplikation erfolgt die Insertion des ganzen Gens in ein homologes Chromosom oder in das Schwesterchromatid, wodurch die dunkelblauen Exons und die hellblauen Introns inseriert werden und das Gen doppelt vorliegt.

Im menschlichen Genom existieren über 20000 Pseudo-/Retrogene. Einige davon haben sogar Funktionen übernommen. Einige Pseudo-/Retrogene haben wichtige Rollen bei der Translationskontrolle oder der Stabilisierung der mRNA vom homologen kodierenden

Gen (Korneev *et al.*, 1999; Hirotsune *et al.*, 2003). Das Rhodopsin in der Retina der Knochenfische wird zum Beispiel von einem Retrogen kodiert (Bellingham *et al.*, 2003). Das Gen weist zwar im Vergleich zum Wildtypgen wenige Mutationen auf, trotzdem wird es für die Expression des Rhodopsins als einziges in der Retina benutzt.

Ein anderes interessantes Gen, welches in ES-Zellen exprimiert wird und ebenfalls Pseudo-/Retrogene hat, ist *Dppa3*. Das Gen *Dppa3* liegt mit *NANOG* auf Chromosom 12 und wird selektiv in den ES-Zellen transkribiert. Eins seiner Pseudo-/Retrogene konnte aber schwach im Knochenmark, im peripheren Blut, im Pankreas und in der Nebenniere detektiert werden (Elliman *et al.*, 2006).

Bei einer Genduplikation wird ein Genomabschnitt durch ein ungleiches Crossing over zwischen homologen Chromosomen oder den Schwesterchromatiden dupliziert. Es entsteht ein Chromosom, welches ein Gen vervielfältigt trägt.

Durch Mutationen in allen angesprochenen Genkopien können funktionell neue Gene entstehen. Zumeist führen die Mutationen zu Stop-Codons und somit zu einer sinnlosen Kopie.

2.4.2 *NANOG*-Genkopien

Eine der Genkopien von *NANOG* enthält Introns und ist somit eine Genduplikation. Da die Genduplikation *NANOG2* (*alias NANOGP1*) genannt wurde (Hart *et al.*, 2004), wurde das tatsächliche Gen in *NANOG1* umbenannt. *NANOG1* und *NANOG2* liegen mit gleicher Orientierung auf dem gleichen Chromosomenarm und sind durch 96,3 kbp getrennt (Booth and Holland, 2004).

Die restlichen Genkopien (*NANOGP2-NANOGP10*) gehören zu den intronlosen Pseudo-/Retrogenen, die im Verlauf der Evolution Punktmutationen, Deletionen und Insertionen erlangt haben. Diese Veränderungen führten öfter zu Rasterverschiebungen oder zu Stopkodierenden Codons, wie in Abbildung 2.6 zu sehen ist. Eins der Pseudogene ist ein kurzes Überbleibsel der 3'UTR und wurde in der Abbildung nicht abgebildet. Die Insertionen, Deletionen sind durch Zahlen und die dadurch entstandenen Stop- oder Start-Codons durch rote Balken erkenntlich gemacht worden. Die dabei noch übrig gebliebenen längsten Leserahmen, die die Homeodomäne (blau) beinhalten, sind dunkelgrau untermalt.

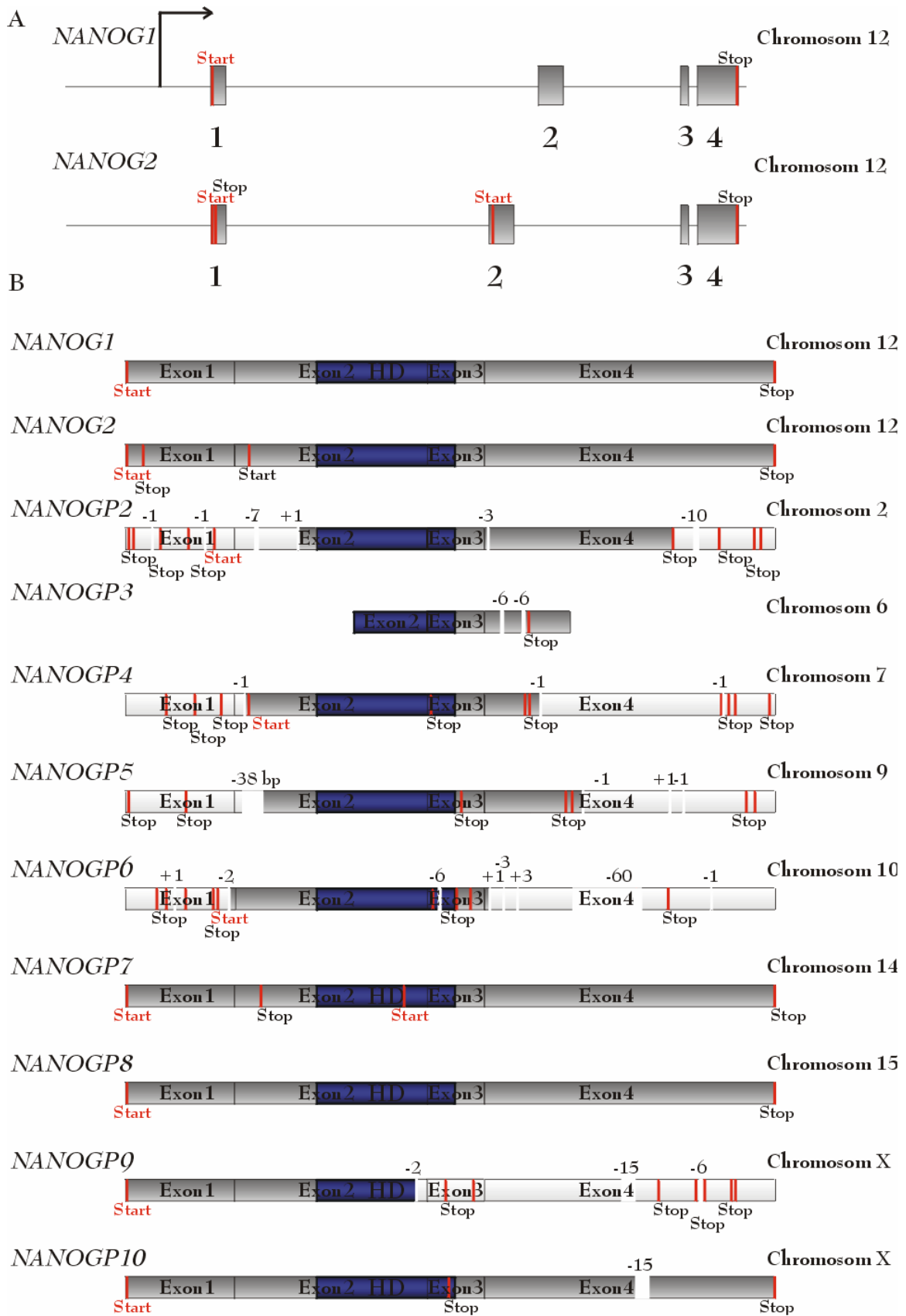


Abb. 2.6: Darstellung des Genaufbaus von *NANOG1* und *NANOG2* und den Pseudo-/Retrogenen.

(A) Darstellung des genomischen Aufbaus von *NANOG1* und *NANOG2*. Die vier Exons in beiden Genen sind durch graue Rechtecke dargestellt. Die zwischen den Exons liegenden Introns sind als Linie markiert. Die unterschiedlichen Intronlängen von *NANOG1* und *NANOG2* entstanden durch die zusätzliche Integration von Alu-Elementen. Die Start- und Stop-Codons sind durch rote Balken dargestellt. Die Expression des Gens wird durch den Pfeil oberhalb vom Exon 1 gezeigt. (B) Darstellung der aneinander gereihten Exons von *NANOG1* und *NANOG2* und der Pseudogene. Die Pseudogene sind durch zahlreiche Deletionen (- Zahl oberhalb des Pseudogens) oder Insertionen (+ Zahl oberhalb des Pseudogens) durchlaufen. Die Mutationen führen zu Leserahmenverschiebungen. Der längste für NANOG kodierende Leserahmen wird als dunkelgrauer Bereich markiert. Die Homeodomäne ist als dunkelblauer Bereich zu erkennen.

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, haben *NANOG1*, *NANOG2* und *NANOGP8* den längsten Leserahmen behalten können. Von allen Genkopien scheint *NANOGP8* die größte Homologie mit *NANOG1* zu haben. *NANOG2* weist 97 % und *NANOGP8* 99 % Identität mit *NANOG1* auf (Booth and Holland, 2004). Auch murine Zellen enthalten *Nanog*-Pseudogene/Retrogene. Zwei der vier Pseudo-/Retrogene konnten sogar die Selbsterneuerung der ES-Zellen ohne die LIF-Zugabe ermöglichen (Robertson *et al.*, 2005; Booth and Holland, 2004).

Die Transkription von *NANOG2* wurde in embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomazellen schwach detektiert (Hart *et al.*, 2004). Weiterhin wurden ESTs von dem Gen aus den embryonalen Karzinomazellen isoliert.

Transkriptionen von anderen Pseudogenen und von *NANOGP8* wurden bisher nicht in ES- oder embryonalen Karzinomazellen gefunden. *NANOG2* scheint somit die einzige Genkopie zu sein, die neben *NANOG1* in ES-Zellen und embryonalen Karzinomazellen transkribiert wird (Hart *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

Interessanterweise liegt es auf dem 12. Chromosom zwischen den anderen ES-spezifischen Genen, wie *NANOG1*, *OCT4* und *Dppa3*. Diese Region repräsentiert nur 0,01 % des Genoms und wird vermutlich in den ES-Zellen simultan epigenetisch reguliert. Die Gene könnten demnach durch eine gleichzeitige Chromatinveränderung alle gemeinsam aktiviert werden (Elliman *et al.*, 2006). In embryonalen Karzinomazellen, die *NANOG* und *OCT4* exprimieren, liegen die Bereiche vor den beiden Genen im Gegensatz zu den differenzierten Zellen unmethyliert vor. (Freberg *et al.*, 2007).

Es ist durchaus möglich, dass *NANOG2* transkribiert wird, denn in den Versuchen *NANOG1* mittels siRNA herunterzuregulieren, zeigte eine siRNA, die sowohl an

NANOG1 als auch an *NANOG2* gebunden hat die effektivste Wirkung (Hyslop *et al.*, 2005). Die damit behandelten ES-Zellen differenzierten in das extraembryonale Endoderm und das Trophoektoderm.

NANOG2 scheint auch in der Testis exprimiert zu werden, denn es wurden ESTs von *NANOG2* in diesem Gewebe gefunden.

Aufgrund einiger Mutationen verlor *NANOG2* seine absolute Sequenzübereinstimmigkeit mit *NANOG1*. Interessanterweise konnte von allen Genkopien aber nur *NANOG2* die 5'UTR von *NANOG1* behalten. Alle *NANOG*-Pseudo-/Retrogene enthalten diesen Bereich nicht mehr.

Bei einer genauen Überprüfung der Transkripte von *NANOG2* wurde in ES- und EC-Zellen ein Transkript detektiert, in dem ein anderes Gen involviert war (siehe Abb. 2.7) (Booth and Holland; Hart *et al.*, 2004). Die Sequenz stimmt mit dem EST von *NANOG2* überein, welches in der Testis vorher gefunden wurde.

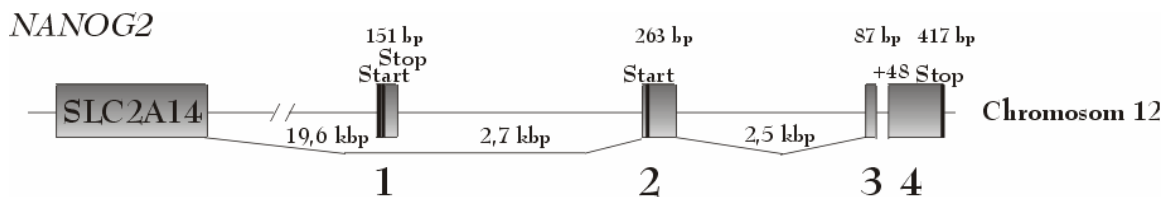


Abb. 2.7: Darstellung des *NANOG2*-Aufbaus nach Hart *et al.*

Eine interne Spleißstelle im Gen *SLC2A14* wird beim Spleißen zu Exon 2 von *NANOG2* benutzt. Das erste Exon wird durch das Spleißen weggelassen. Das im zweiten Exon liegende Start-Codon kann für die Translation benutzt werden. Typische für die Transkripte von *NANOG2* sind die fehlenden 48 bp im Exon 4. Die Größen der Exons und Introns sind als Zahlen dargestellt.

Das erste Exon von *NANOG2* ist wegen eines Stop-Codons, das direkt nach dem Start-Codon liegt, für eine Proteinsynthese ungeeignet (Booth and Holland, 2004). Bei dem von Hart *et al.* beschriebenen Transkript spleißt eine etwa 19,6 kbp aufwärts liegende Sequenz aus dem Gen *SLC2A14* zu Exon 2 von *NANOG2* und schließt das Stop-kodierende Exon aus dem Transkript aus. Das Exon 2 weist ein zweites Methionin-Triplett auf, das für die Proteinsynthese benutzt werden könnte. Weiterhin wird beim Spleißen eine andere Spleißakzeptorstelle im Exon 4 benutzt, wodurch die mRNA die ersten 48 bp von Exon 4 verliert. Diese Spleißvariation wurde auch bei *NANOG1* beobachtet (Kim *et al.*, 2005). Der offene Leserahmen wird dadurch nicht verschoben.

Weiterhin wurde eine zweite aus dem Pankreastumor isolierte EST-Sequenz von *NANOG2* von Booth und Holland beschrieben, welche ein anderes Spleißmuster enthält. Danach spleißt das erste Exon von *NANOG2* zu einer Sequenz, die nur 1,7 kbp aufwärts vom ersten Exon liegt. Durch das Spleißen verliert das erste Exon 16 bp. Diesem EST wurde aufgrund seiner Kürze keine Beachtung mehr geschenkt (Booth and Holland, 2004).

Die Transkripte einiger Pseudogene wurden in mehreren Tumorzellen oder Zelllinien bereits detektiert. Das Retrogen *NANOGP8* wurde in Brust-, Blasen- und Cervixtumoren transkribiert, die auch *NANOGP2*, *NANOGP4* und *NANOGP7* aufwiesen. *NANOGP8* wurde jedoch viel schwächer als das tatsächliche *NANOGL* in Zellen transkribiert.

Durch die Überexpression von *NANOGP8* in murinen embryonalen Fibroblastenzellen konnte sogar die Proliferation dieser Zellen gefördert werden.

Auch konnten Transkripte von *NANOGP5* und *NANOGP4* in Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2006). *NANOGP5* ESTs wurde außerdem aus der Leber und der Plazenta kloniert (Booth and Holland, 2004).

2.5 Funktionelle Domänen und Funktion von NANOG

Das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer Homeodomäne, die einige Ähnlichkeiten mit der Nkx-Genfamilie aufzeigt (Yates and Chambers, 2005). Alle anderen Domänen weisen das Protein aber einem bisher neuen Proteintypen zu. Es besteht aus einem serinreichen N-Terminus (ND), der durch die Homeodomäne von dem C-Terminus getrennt ist. In der Homeodomäne liegt das Nukleuslokalisierungssignal (NLS), welches den Eintritt des Proteins in den Kern ermöglicht. Die Homeodomäne selber enthält ein Helix-turn-Helix-Motiv, welches an DNA bindet (Do *et al.*, 2007).

Während bei dem murinen Nanog sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende die Transaktivierungsfunktion detektiert wurde, liegt diese im humanen NANOG nur im C-Terminus (Pan and Pei, 2005; Oh *et al.*, 2005). In dem C-terminalen Teil wurden zwei Transaktivationsdomänen identifiziert. Die erste Domäne ist tryptophanreich und wird WR (Tryptophan = W Repeat) abgekürzt. Die zweite Domäne befindet sich direkt am C-Ende und wird CD2 genannt (Pan and Pei, 2005). Die Aktivität konnte mit Hilfe eines Reportergens sowohl in pluripotenten als auch nicht pluripotenten Zellen gezeigt werden.

Nanog konnte demnach auch in nicht pluripotenten Zellen das Reportergen aktivieren. Die Aktivität beider Transaktivierungsdomänen war aber in ES-Zellen viel stärker. Weiterhin zeigte sich, dass die Tryptophanreste in der WR-Domäne sehr wichtig für die Transaktivität sind. Sobald diese in Alanine mutiert wurden, nahm die Aktivität beträchtlich ab.

Aufgrund des alternativen Spleißens können im Exon 4 48 bp und folglich in der CD1-Domäne 16 AS fehlen. Diese Gegebenheit führt jedoch zu keiner veränderten Funktion (Pan and Pei, 2005; Kim *et al.*, 2005). Die CD1-Domäne fungiert wie ein Linker zwischen den Transaktivierungsdomänen und der Homeodomäne. Weiterhin wurde eine negative Auswirkung von CD1 auf die durch WR regulierte Transaktivität beschrieben (Pan and Pei, 2005; Kim *et al.*, 2005).

Interessanterweise enthält NANOG2 in den drei wichtigsten Domänen WR, CD2 und HD nur drei Missense-Mutationen. Alle anderen Mutationen befinden sich im N-terminalen Bereich, für den noch keine eindeutige Funktion definiert wurde. Zwei der mutierten Aminosäuren in NANOG2 unterscheiden sich zwar vom humanen NANOG1, sind aber mit dem murinen Nanog identisch.

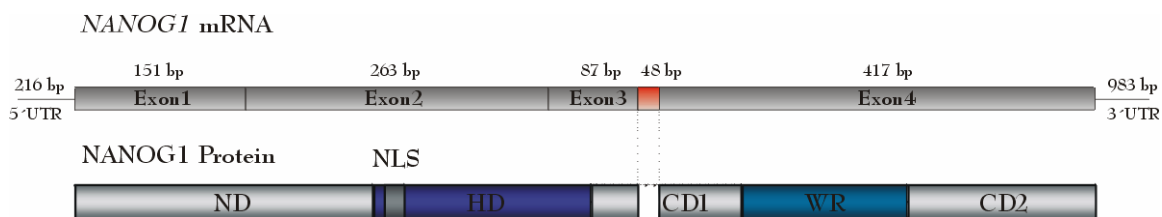


Abb. 2.8: Darstellung der mRNA von NANOG1 und des dazugehörigen Proteins.

Die mRNA setzt sich aus den vier Exons zusammen und wird am 5' Ende von der 216 bp langen 5'UTR und am 3' Ende von der 983 bp langen 3'UTR begrenzt. Im vierten Exon können 48 bp durch das Spleißen wegfallen. Die von den Exons kodierten Proteinbereiche sind im Protein zu erkennen. Exon 1 und halbes Exon2 kodieren für die N-terminale Domäne (ND). Exon2 kodiert für das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die Homeodomäne (HD). Die C-terminale Domäne 1 (CD1) wird teilweise von Exon 3 und teilweise von Exon 4 kodiert. Die beiden wichtigen Domänen WR und CD2 werden von Exon4 kodiert.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass NANOG1 sowohl reprimierende als auch aktivierende Eigenschaften besitzt (Boyer *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Es bindet an Gene, die für Regulatoren der embryonalen Entwicklung kodieren. Viele dieser Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die

Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aufrechterhalten. Einige der reprimierten Gene, die von NANOG1 gebunden werden, sind für Differenzierungsprozesse notwendig.

Durch die bisherigen Versuche konnte demnach gezeigt werden, dass NANOG1 für die Embryogenese essentiell ist und eins der wichtigsten Faktoren bei der Selbsterneuerung und Pluripotenz darstellt.

In der neuesten Studie von Chambers *et al.*, 2007 wurde jedoch die Wichtigkeit vom murinen Nanog für die Pluripotenz in Frage gestellt. Murine ES-Zellen, in denen *Nanog* deletiert wurde, konnten einen undifferenzierten Zustand und die Pluripotenz beibehalten. Die beiden anderen Stammzellmarker Oct4 und Sox2 wurden weiterhin exprimiert. Die einzigen Gegensätze zu den normalen ES-Zellen waren, dass die Zellen sich langsamer teilten und nach 5 bis 7 Tagen bereits differenzierten. Die Transplantation der veränderten ES-Zellen in eine murine Wildtypmorula zeigte eine Verbreitung dieser Zellen in dem gesamten Fötus. Diesen Ergebnissen zufolge ist die kontinuierliche Expression von Nanog für die richtige Differenzierung nicht notwendig. Diese chimäre Embryonen wiesen jedoch keine normale Entwicklung der Vorläuferkeimzellen im embryonalen Stadium E11 auf. Während dieses Stadiums werden normalerweise grundlegende epigenetische Veränderungen in der Zelle durchgeführt. Dies beinhaltet die komplette Erodierung, genomweite Demethylierung des Chromatins und Reaktivierung des X-Chromosoms (Szabo *et al.*, 2002; Hajkova *et al.*, 2002; Monk and McLaren, 1981). Basierend auf diesen Tatsachen scheint Nanog für die Erodierung der epigenetischen Information sowohl in der pluripotenten Zelle als auch in der Keimzelle notwendig zu sein.

2.6 Wirkmechanismus und Zielgene von NANOG1

2.6.1 Modifikationen und Komplexpartner

Der Wirkmechanismus von NANOG1 ist noch nicht bekannt. In murinen Zellen ist Nanog als ein Dimer beschrieben worden, welches bevorzugt an eine Sequenz bindet, die von vielen HD-Proteinen erkannt wird (Jauch *et al.*, 2007). Für die Dimerisierung wird die WR-Domäne benutzt. Sobald die WR-Domäne fehlt, können die Zellen sich nicht

mehr reproduzieren. Die Dimerisierungsdomäne hat demnach eine wichtige Funktion bei der Selbsterneuerung (Mullin *et al.*, 2008).

Auch posttranslationale Modifikationen könnten das Protein und damit die Funktion oder die Interaktion mit Komplexpartnern verändern, denn das murine Nanog ist phosphoryliert (Yates and Chambers, 2005). Beim humanen NANOG1 sind derzeit keine Modifikationen beschrieben worden, es sind jedoch mehrere Proteinbanden mit größeren Massen bereits detektiert worden (Hatano *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005).

Die bekanntesten Proteinmodifikationen sind Phosphorylierungen, Glukosylierungen, Ubiquitinylierungen, Acetylierungen und Sumoylierungen. Sie verändern teilweise die Struktur des Proteins, wodurch dieses besser mit anderen Partnern interagieren kann. Diese Interaktion kann sowohl zum Abbau des Proteins aber auch zu einer veränderten Aktivität führen.

Weiterhin ist eine Interaktion des Proteins in Komplexen, die zwischen 160 kDa und 1 MDa groß sind, beschrieben worden und je nach Komplexpartner könnte das Protein unterschiedliche Funktionen annehmen (Wang *et al.*, 2006). In murinen ES-Zellen wurde eine Interaktion mit den Faktoren Sall4, Dax1, Nac1 und Zfp281 über Co-Immunopräzipitationsanalysen identifiziert. Über die beiden Partner Sall4 und Nac1 kann Nanog mit Histondeacetylasen verbunden sein. Außerdem konnte über die Interaktion mit Oct4 eine nicht physikalische Interaktion mit Polycomb-Repressionskomplex (PRC2) nachgewiesen werden. Ob dieser Komplex die Reprimierung einiger Zielgene reguliert, konnte noch nicht festgestellt werden.

2.6.2 Zielgene von NANOG1

NANOG1 bindet in *cis* oder *trans* an andere Gene, die selbsterneuernde Prozesse oder eine Zelldifferenzierung ermöglichen (Boyer *et al.*, 2005). Eine Analyse der humanen Promotoren ergab, dass NANOG1 in humanen ES-Zellen an 1678 Promotoren bindet, wobei die Hälfte auch von OCT4 gebunden wird. Etwa ein Drittel dieser gemeinsamen Gene wird ebenfalls von SOX2 gebunden (359 Gene). Von den 359 gemeinsam regulierten Genen kodieren 105 für Transkriptionsfaktoren, die für die embryonale Entwicklung zuständig sind.

Insgesamt bindet NANOG1 alleine an 1303 Gene, die in ES-Zellen aktiv und an 957 Gene, die stumm sind (Ivanova *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Viele der von NANOG1 gebundenen aktiven Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die für die Pluripotenz und die Selbsterneuerung notwendig sind. Die von den reprimierten Genen kodierten Proteine sind für die Differenzierung wichtig, womit NANOG1 indirekt die Zelldifferenzierung inhibiert. Wie NANOG1 die Inhibierung dieser Gene ermöglicht, ist *bis dato* nicht beschrieben worden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Genexpression-inhibierenden Polycomb-Repressionskomplex (PRC2) an viele der von Nanog gebundenen Gene ebenfalls bindet (Lee *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2006). Die Proteine sind als transkriptionelle Repressoren in der Entwicklung der Metazoa beschrieben worden (Ringrose and Paro, 2004). Die Reprimierung der Gene basiert auf epigenetischer Modifikation des Chromatins. Der Repressor bindet an viele Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, die für die Differenzierung wichtig sind und methyliert die H3 Histone vor dem Gentranskriptionsstart am Lysinrest 27. Diese reversible Modifikation bewirkt eine Kondensierung des Chromatins, wodurch die Gene nicht mehr abgelesen werden können. Die Gene von *Oct4* und *Nanog* scheinen von dieser Modifikation aber nicht betroffen zu sein (Boyer *et al.*, 2006).

Eine weitere Studie zeigte, dass in murinene ES-Zellen etwa 50 % der von Nanog, Oct4 oder Sox2 gebundenen Genen bivalente Domänen sowohl mit aktivierenden als auch mit reprimierenden Histonmodifikationen aufweisen (Bernstein *et al.*, 2006). Die bivalenten Domänen vor Genen, die oft für Transkriptionsfaktoren kodieren, enthalten sowohl H3K 27- als auch H3K4- Methylierungen. Im ersten Fall handelt es sich um eine reprimierende Modifikation, die oft von Polycomb-Repressionskomplex (PRC2) katalysiert wird. Die zweite Modifikation ist aktivierend und wird von Trithoraxproteinen katalysiert. Durch diese bivalenten Domänen bleiben die Gene in den Stammzellen still, aber bereit für eine Transkriptionsaktivierung. Sobald die Lysin 27-Methylierung entfernt wird, werden die Gene aktiv.

In differenzierten Zellen werden die Gene, die ursprünglich bivalente Domänen enthielten, verstärkt von H3K27- oder von H3K4-Methylierungen okkupiert. Nur noch wenige Gene weisen dann eine bivalente Domäne auf. Inwieweit NANOG1 in die Regulation dieser Modifikationen eingreift, ist noch nicht beschrieben worden.

2.7 t(4;11)-Leukämie

2.7.1 Leukämieentstehung

Bei einer Leukämie werden aufgrund einiger Mutationen abnormale Blutzellen gebildet, die ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben, sich im Knochenmark ungehemmt vermehren und dadurch gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen verdrängen. Je nach Ursprung der veränderten Blutzelle wird zwischen lymphatischer und myeloischer Leukämie unterschieden. Nach Ausbildung einer großen Tumormasse diffundieren die veränderten Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut und infiltrieren im letzten Stadium andere Organe (Hoffbrand *et al.* 1993; Hoelzer *et al.*, 1997). Die Leukämien können in akute oder chronische Formen unterteilt werden. Oft werden die akuten lymphatischen Leukämien als ALL und akute myeloische Leukämien als AML abgekürzt. Beide Leukämiearten entstehen aus Zellen, die entweder noch pluripotent sind oder sich im frühen Stadium der Zellentwicklung befinden. Gehäuft treten Leukämien aufgrund von Chromosomentranslokationen auf, wobei es zu Chromosomenveränderungen kommt (Rabbitts, 1994). Sie sind charakterisiert durch die Entstehung reziproker Fusionsgene, die für chimäre Fusionsproteine codieren. Ihre veränderten Eigenschaften sind für die Entartung der Zelle verantwortlich. Denn häufig kodieren die intakten Gene für Faktoren, die die Entwicklung oder die Differenzierung der hämatopoetischen Zelle regulieren (Rabbitts, 1999).

Die akute lymphatische t(4;11)-Leukämie (ALL), deren eine Translokation zwischen Chromosom 11 und Chromosom 4 zugrunde liegt, wurde zum ersten Mal 1979 beschrieben. Durch die Ortung der Bruchpunktregionen konnten die Gene ermittelt werden, die bei der Translokation beteiligt sind. Das auf Chromosom 11 sich befindende Gen konnte als *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) und der Translokationspartner als *AF4* (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*) identifiziert werden (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992).

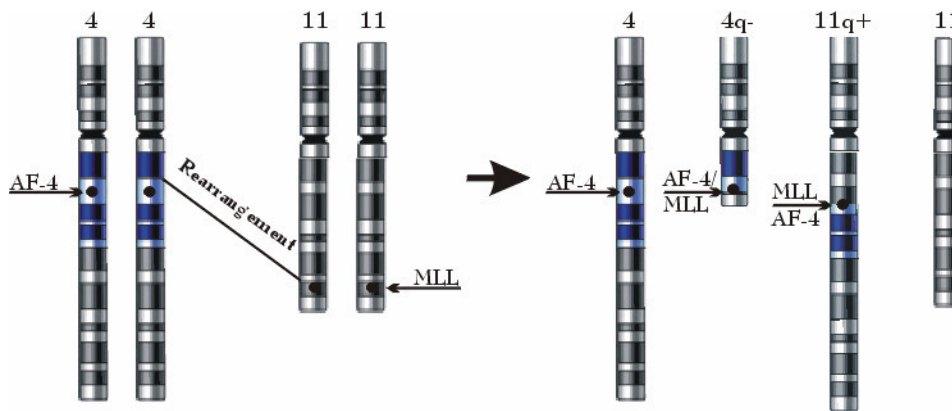


Abb. 2.9: Darstellung der Translokation zwischen *AF4* auf dem Chromosom 4 und *MLL* auf dem 11. Chromosom.

Das als blau markierte Gen *AF4* und das als grau markierte Gen *MLL* können aufgrund von Chromosomenbrüche miteinander rearrangieren. Es entsteht das kürzere Chromosom mit dem Fusionsgen *AF4/MLL* und das längere Chromosom mit dem Fusionsgen *MLL/AF4*.

2.7.2 Klinische Charakteristika einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Die primäre Leukämie kommt gehäuft bei Kleinkindern und Säuglingen vor, während eine sekundäre nach einer Therapie sich entwickelnde Leukämie auch in adulten Patienten vorzufinden ist. Die Inzidenz einer t(4;11)-Leukämie bei therapierten Erwachsenen beträgt 5 % und macht bei Kleinkindern 40% aller Leukämien aus (Felix *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1998).

Die Erkrankung zählt aufgrund der schlechten Prognose und Therapierbarkeit zu der Hochrisiko-Leukämie.

2.8 Molekulare Grundlagen der t(4;11)-Translokation

2.8.1 Funktionelle Domänen und Funktion von MLL

Sowohl MLL als auch AF4 sind nukleäre Proteine, die essentiell für die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen sind.

Das MLL wird aufgrund einiger Gemeinsamkeiten zu der Trithorax-Familie zugeordnet, die die Chromatinstruktur verändern und diesen Zustand fortwährend aufrechterhalten (van Lohuizen, 1999). Zu den Gemeinsamkeiten dieser Proteinfamilie zählt unter anderem die SET-Domäne, die an transkriptionell regulatorischen Prozessen beteiligt ist (Tschiersch *et al.*, 1994). Sie vermittelt die Methyltransferase-Aktivität von MLL an

H3K4 (Nakamura *et al.*, 2002). Über die Transaktivierungsdomäne TAD kann das MLL an CREB (cAMP-Response-Element Binding protein) und folglich an CBP (CREB-Binding-Protein) binden, welches die Transkription der Zielgene aktiviert (siehe Abb. 2.10) (Ernst *et al.*, 2001). Eine weitere herausragende Gemeinsamkeit der Proteingruppe stellt die PHD (plant homeo domain)-Finger dar. Sie haben Protein-Protein-Interaktionspotenzial und beeinflussen möglicherweise die Expression von Zielgenen (Fair *et al.*, 2001).

Charakteristisch für MLL sind die AT-Haken und die MT-Domäne. Über die AT-Haken bindet das MLL an die DNA (Zelevnik-Le *et al.*, 1994). Die MT-Domäne weist Homologien zur DNA-Methyltransferase I (MT) auf, die ebenfalls die Bindung an die DNA, spezifisch an nicht methylierte CpG-Inseln ermöglicht (Birke *et al.*, 2002).

Das 435 kDa große Protein wird direkt nach der Translation in zwei Polypeptide (p300 und p180) durch das Enzym Taspase 1 (Threonin Protease) an zwei Stellen (CS1 und CS2) gespalten (Yokoyama *et al.*, 2002). Erst eine Spaltung und die Zusammenlagerung der beiden Peptide an den sogenannten FYRN/FYRC-Domänen zu einem Dimer ermöglicht die Bildung eines MLL-Komplexes. Der Komplex dient danach als Plattform für die Etablierung eines Multiproteinkomplexes (Nakamura *et al.*, 2002). Zu den Proteinen, die in dem Komplex nachgewiesen werden konnten, zählen sowohl aktivierende Faktoren wie Transkriptionsfaktoren TFIID, der SWI/SNF-Komplex als auch reprimierende Komplexe wie NuRD und Sin3A. Ein weiterer wichtiger Partner des Komplexes ist die Histon 4 Lysin 16 Acetyltransferase MOF. Somit ist der MLL-Komplex sowohl an dem Methyl- als auch an dem Acetyltransfer beteiligt (Dou *et al.*, 2005). Es bindet an transkriptionell aktive Chromosomenabschnitte und erzeugt an den Genen spezifische Histon-Methylierungs-, Acetylierungsmuster und DNA-Methylierungen, die stabil an die Tochterzellen weiter gegeben werden (Tschiersch *et al.*, 1994).

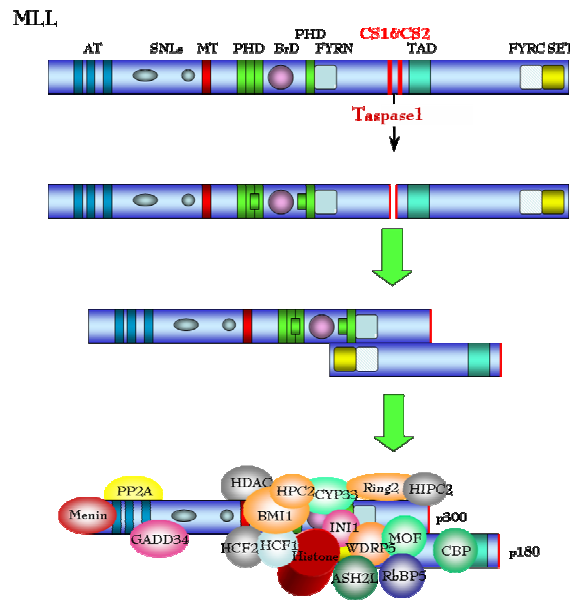


Abb. 2.10: Schematische Darstellung des MLL-Proteins und des MLL-Proteinkomplexes

AT: drei AT-Haken zur Bindung an die DNA; **SNL:** sub-Nukleäres Lokalisationssignal; **MT:** cysteinreiches Motiv mit starker Homologie zur DNA Methyltransferase zur Bindung nicht methylierter CpG-Inseln; **PHD:** 4 PHD-Finger; **BrD:** Bromo- und **TAD:** Domäne vermitteln Protein-Protein-Interaktion; **FYN/C:** F/Y-reicher Abschnitt; **CS1/2:** Taspaseschnittstelle 1 und 2; **SET:** Domäne dient zur Methylierung von Histon H3 am Lysinrest K4. Die Komplexierung der beiden Spaltprodukte p300 und p180 über die Interaktionsdomänen FYN und FYRC stabilisiert und bildet die Plattform für den Multiproteinkomplex aus etwa 27 anderen Proteinen.

Das MLL hat eine essentielle Funktion bei der Embryogenese, denn murine $MLL^{-/-}$ Embryonen können nur bis zum Tag 10,5 überleben (Yu *et al.*, 1995). Außerdem ist es für die präzise Segmentierung des Körperbauplans zuständig. In *Drosophila* $MLL^{-/-}$ Embryonen konnte keine *HOX*-Genexpression detektiert werden, die für die Segmentierung während der Embryonalentwicklung essentiell sind (Gaunt and Strachan, 1994).

Das MLL spielt auch eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, denn in $MLL^{-/-}$ Embryonen sind die Differenzierungsprozesse von hämatopoetischen Vorläuferzellen gestört (Hess *et al.*, 1997). Weitere Untersuchungen der hämatopoetischen Zellen hob auch die Wichtigkeit des MLL in der Entwicklung hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen hervor (Ernst *et al.*, 2004). Die Daten sprechen dafür, dass das MLL die Expression wichtiger Gene der frühen Phase der Hämatopoese steuert, vor allem durch die Regulation der *Hox*-Gene.

2.8.2 Struktur und Funktion von AF4

Das AF4 ist vermutlich ein Transkriptionsfaktor, der aufgrund einiger Domänen zu der Proteinfamilie ALF zugerechnet wird (Nilson *et al.*, 1997). Es verfügt über eine NHD/CHD (N-/C-terminal homologous domain), eine NLS (nuclear localisation signal), eine ALF- und über eine pSer-(Prolin-Serin-reiche) Domäne (siehe Abb. 2.11).

In funktionellen Studien wurde gezeigt, dass AF4 transkriptionell aktivieren kann und folglich ein Transkriptionsfaktor sein könnte (Prasad *et al.*, 1995; Ma and Staudt 1996; Nilson *et al.*, 1997; Taki *et al.*, 1999). Eine ganz wichtige Rolle wurde dem Protein in hämatopoetischen Zellen zugeschrieben. Mäuse mit einer homozygoten AF4-Deletion wiesen eine gestörte B- und T-Zellentwicklung auf (Isnard *et al.*, 2000).

Weiterhin wurde eine Fehlfunktion in der Entwicklung der Purkinje-Zellen im zentralen Nervensystem festgestellt, sobald das AF4-Protein in murinen Embryonen mutiert wurde (Isaacs *et al.*, 2003).

Das Protein bildet ein Komplex mit ENL, AF9, DOT1L, AF10 welche die transkriptionelle Elongation beeinflussen (Zeisig *et al.*, 2005, Benedikt *et al.*, unpublished).

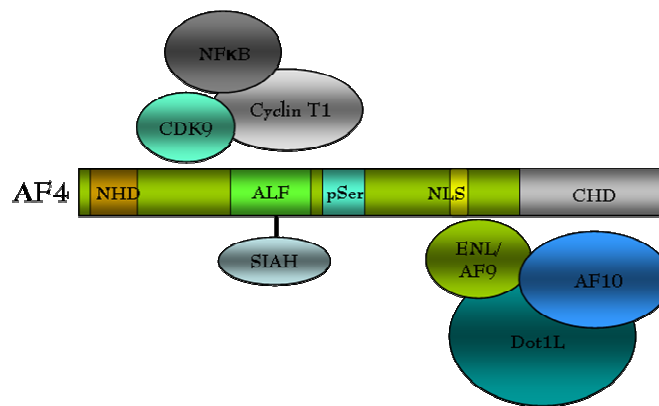


Abb. 2.11: Darstellung des AF4-Multiproteinkomplexes.

Die N-terminalen und C-terminalen Bereiche werden als NHD und CHD (HD: Homologiedomäne) abgekürzt. Das Protein weist die ALF-Domäne auf, welches es zu den ALF-Genfamillie zuordnet. pSer ist die Serin-Prolin-reiche Domäne. NLS: Kernlokalisationssignal.

2.8.3 Funktion der Fusionsproteine Derivat 11 und Derivat 4

Die Translokation zwischen *MLL* und *AF4* findet zumeist in Intronbereichen der Gene statt, wodurch die offenen Leserahmen beider Gene nicht verändert werden (Marschalek *et al.*, 1997). Die beiden Fusionsgene kodieren für das Derivat 11, bestehend aus dem N-Terminus von *MLL* und dem C-Terminus von *AF4* und dem reziproken Protein Derivat 4 aus dem N-terminalen *AF4*-Teil und dem C-terminalen *MLL*-Stück.

Das Derivat 11 enthält neben den AT-Haken und der Methyltransferase-Domäne von *MLL* zusätzlich die CHD, die NLS und die Serin-reiche Domäne von *AF4* (siehe Abb. 2.12). Es kann somit sowohl in den Nukleus importiert werden als auch an die DNA binden. In Überexpressionsstudien wurde ein Effekt auf den Zellzyklus und die Apoptose gezeigt (Caslini *et al.*, 2004, Gaussmann *et al.*, 2007). Die Derivat 11 exprimierenden Zellen wuchsen langsamer und waren gegenüber apoptotischen Stimuli resistenter als der Wildtyp. In diesen Zellen waren die pro-apoptotischen Gene stärker reprimiert als in Kontrollzellen.

Das Derivat 4 verfügt im N-Terminus über die ALF-Domäne und enthält im C-Terminus die PHD-Finger, die Transaktivierungsdomäne, die FYRN/FYRC-Domänen und die SET-Domäne von *MLL*. Sobald Derivat 4 in der murinen Fibroblastenzelllinie MEF überexprimiert wird, zeigt sich sowohl eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen bei hoher Zelldichte, als auch eine Zunahme an apoptotischen Zellen und die Herunterregulierung der anti-apoptotischen Gene (Gaussmann *et al.*, 2007).

Beide Fusionsproteine scheinen demnach ein onkogenes Potential zu besitzen (Gaussmann *et al.*, 2007).

Zellen, die sowohl Derivat 11 als auch Derivat 4 besitzen, weisen einige der angesprochenen Eigenschaften von den beiden vorher beschriebenen Zellen auf. Es wurde in MEF-Zellen, die mit beiden Fusionsgenen transfiziert waren, eine verstärkte Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose gezeigt. Außer den pro-apoptotischen Genen waren auch Inhibitoren der Zellzyklus-aktivierenden Faktoren reprimiert.

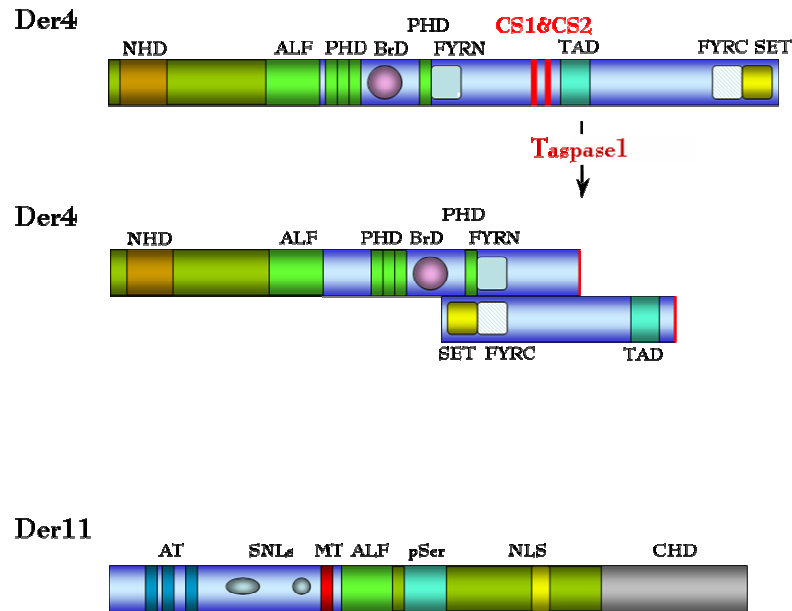


Abb. 2.12: Vergleich des AF4-MLL (Der4) mit dem MLL-AF4 (Der11)-Fusionsprotein.

Darstellung der Proteine mit den jeweiligen Domänen. Die verwendeten Abkürzungen sind in den Abbildungen 2.10 und 2.11 erläutert.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

In vielen Tumorarten konnte bereits die Expression von NANOG1 gezeigt werden. Das Protein wurde bisher als ein essentieller Faktor in ES-Zellen für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und der Pluripotenz beschrieben. Dadurch können die ES-Zellen sich unlimitiert teilen und in alle Zellen differenzieren. Die gleichen Eigenschaften werden ebenfalls für Tumorzellen beschrieben. Bisher wurde jedoch davon ausgegangen, dass NANOG1 nicht in Tumoren exprimiert wird, die keine Krebsstammzellen enthalten, denn NANOG1 schien nur auf Krebsstammzellen beschränkt zu sein. In der Arbeit von Gaussmann *et al.* konnte jedoch eine Nanog-Überexpression in murinen Fibroblastenzellen, die eine t(4;11)-Fusionsproteine exprimierten, detektiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die NANOG1-Genexpression, in humanen hämatopoetischen Zellen von t(4;11)-Patienten und in unterschiedlichen Tumorzelllinien zu überprüfen und dabei die Transkription und die Wirkungsweise näher zu untersuchen. Dazu sollten zunächst 15 Patienten mit t(4;11)-Translokation und 8 Zelllinien auf die Transkription von *NANOG1* und seiner Zielgene mittels RT-PCR überprüft werden. Im Verlauf der

Arbeit stellte sich heraus, dass nicht das *NANOG1* selber, sondern das Genduplikat *NANOG2* in den Tumorzellen transkribiert wird. Da bisher keine grundlegenden Untersuchungen zu diesem Gen in der Literatur beschrieben worden sind, sollte das Gen zunächst auf der Gen- und danach auf der Proteinebene untersucht werden. Gleichzeitig sollte der putative Promotor charakterisiert werden. Dazu wurden Reporter-genassays und ChIP-Analysen durchgeführt.

Mittels der Genexpressionsanalyse sollten Expressionsprofile erstellt und die Funktion von *NANOG1* und *NANOG2* verglichen werden. Die Ergebnisse sollten dann mittels der RT-PCR überprüft werden.

Außerdem sollten die Expressionsprofile dazu dienen, die Zielgene von *NANOG2* zu ermitteln.

Durch diese Arbeit sollte zunächst das in ES-, EC- und vielen Tumorzellen transkribierte *NANOG2* charakterisiert und anschließend die Frage geklärt werden, ob es die Funktion von *NANOG1* übernimmt oder eine andere, entscheidende Rolle in der Zelle spielt.

3 Ergebnisse

Genexpressionsprofile von murinen Fibroblastenzellen, die mit beiden reziproken t(4;11) Fusionsgenen stabil transfiziert waren, wiesen ein transkriptionell aktives *Nanog*-Gen auf (Gaussmann *et al.*, 2007). Die transkriptionelle Aktivität von *Nanog* war im Verhältnis zu Zellen ohne die beiden Fusionsgene sechzehnfach erhöht. Diese Zellen zeigten zudem unter Stressbedingungen eine erhöhte Proliferation und Apoptoseresistenz gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen. Dies führte zu der Annahme, dass die beiden t(4;11)-Fusionsproteine zusammen mit dem Nanog-Protein an der Entwicklung des transformierten Phänotyps beteiligt sind.

Das *Nanog*-Gen wurde bislang nur in Vertebraten gefunden. Das humane Pendant *NANOG1* kodiert wie sein muriner Vertreter für einen wichtigen Transkriptionsfaktor, der in ES-Zellen exprimiert wird und an der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters beteiligt ist. Seine Expression verhindert die Differenzierung der Zellen und ermöglicht eine ununterbrochene Zellteilung, die ähnlich in Tumorzellen zu finden ist. Aufgrund unserer Annahme, dass die NANOG1-Überexpression die Tumorentwicklung entweder fördert oder aufrechterhält, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob NANOG1 auch in humanen t(4;11)-Zellen exprimiert wird, und ob diese dabei in Stammzell-ähnliche Zellen umprogrammiert werden.

3.1 Genexpressionsanalyse von NANOG1 und seiner Zielgene in t(4;11)-Zellen, anderen Tumorzelllinien und Kontrollzellen aus gesunden Probanden

3.1.1 Transkriptionsanalysen der NANOG1-Zielgene

Um die Auswirkung der NANOG1-Expression in t(4;11)-Zellen und in Tumorzellen zu analysieren, sollte zunächst die Transkription von *NANOG1* und ausgewählter Zielgene dieses Stammzellfaktors mittels RT-PCR-Experimente überprüft werden.

Die Zielgene der drei Stammzellproteine NANOG1, OCT4 und SOX2 waren bereits durch Chip-on-Chip-Analysen bestimmt und ausführlich in dem Artikel von Boyer *et al.* beschrieben worden. Diese Proteine regulieren gemeinsam 359 Gene, deren

Transkription sie reprimieren oder induzieren können (siehe Abb. 3.1). Die Inhibierung erfolgt unter anderem durch die Zusammenarbeit mit dem Polycomb-Repressionskomplex (PRC2).

Unter den 180 Genen, die durch NANOG1, OCT4 und SOX2 aktiviert werden, befinden sich 39 Transkriptionsfaktoren, die für Signalwege, Chromatinveränderungen und der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters entscheidend sind. Etwa 180 Gene werden durch NANOG1 reprimiert. Davon kodieren 66 für Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Keimblattdifferenzierung regulieren.

TF: Transkriptionsfaktor

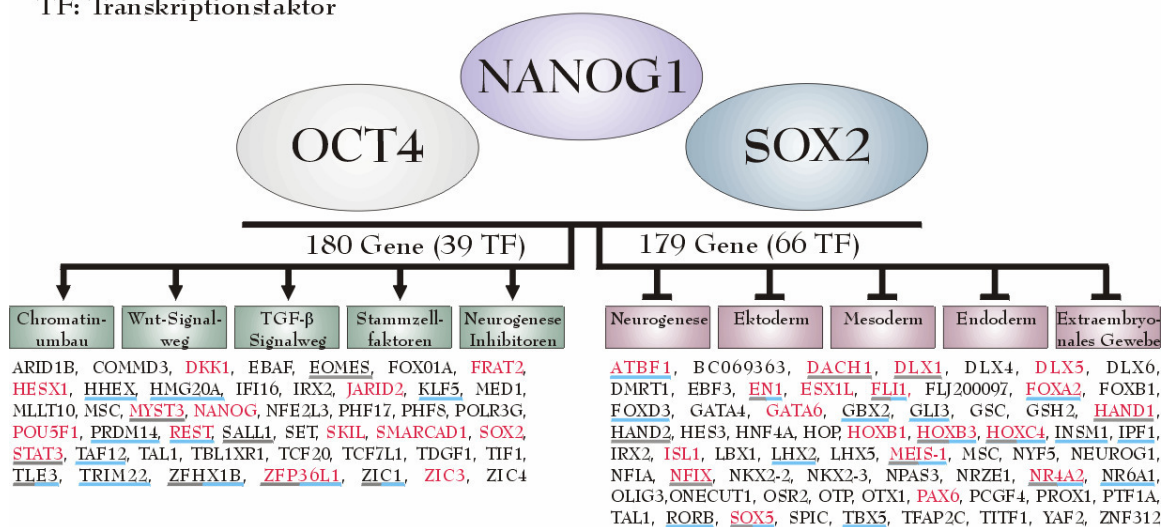


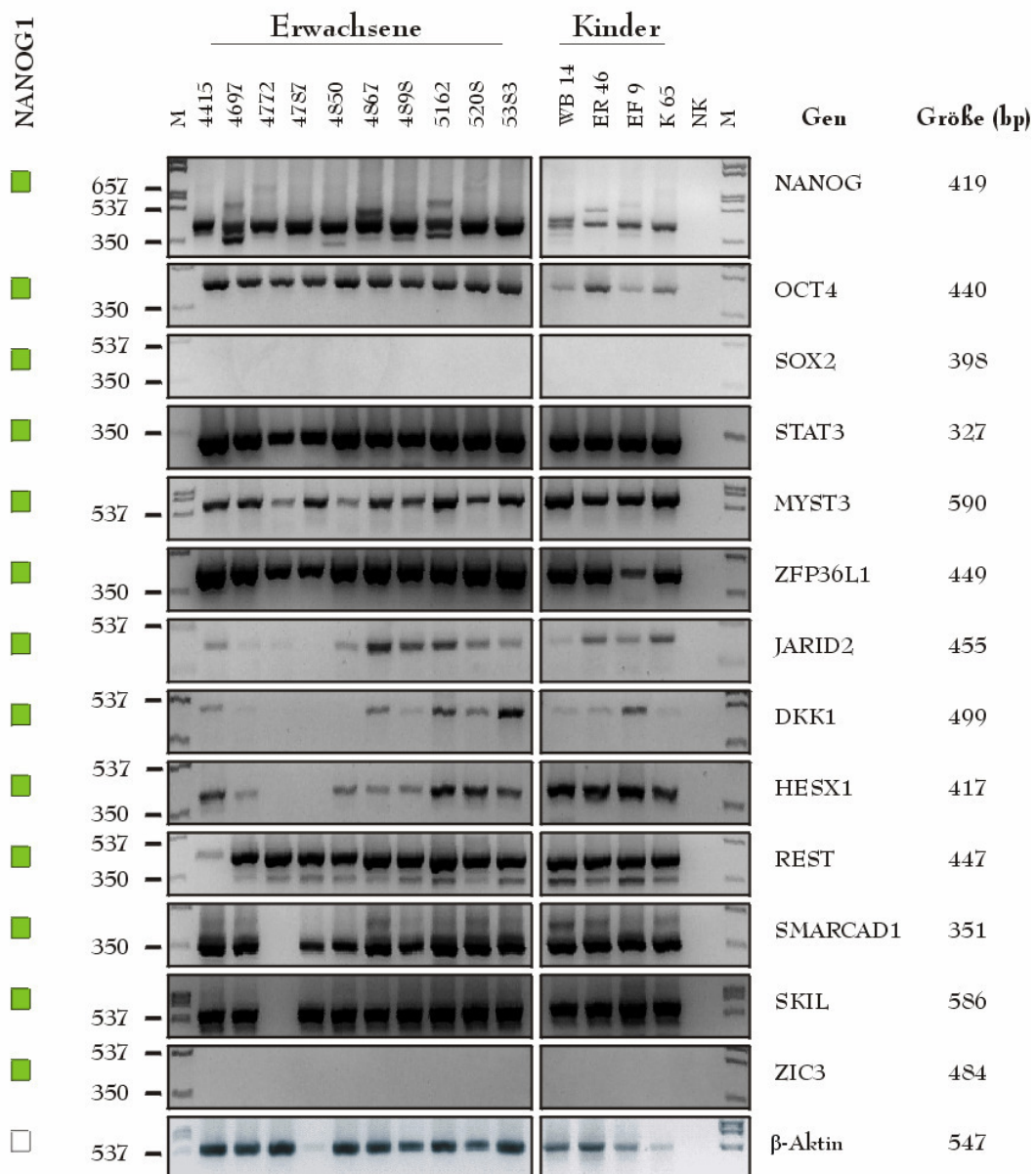
Abb.: 3.1: Gemeinsame Regulation der Targetgene durch NANOG1, OCT4 und SOX2.

180 Gene werden induziert und 179 Gene reprimiert. Von den 180 Genen kodieren 39 für Transkriptionsfaktoren. Unter den 179 reprimierten Genen, kodieren 66 für Transkriptionsfaktoren. Gene, die durch RT-PCR-Experimente untersucht wurden, sind rot markiert. Die von MLL regulierten Gene sind blau, die von AF4 kontrollierten Gene grau unterstrichen.

Die in dieser Arbeit durch RT-PCR-Experimente untersuchten Gene sind in Abbildung 3.1 rot hervorgehoben. Beim Oligonukleotiddesign wurde beachtet, dass die Oligonukleotide in Exons binden, die durch Introns getrennt sind, um dadurch zu gewährleisten, dass bevorzugt mRNA detektiert wird.

3.1.2 Analyse der transkribierten NANOG1-Zielgene in t(4;11)-Patientenzellen

Aus dem peripheren Blut von 10 Erwachsenen und 4 Kindern, die eine t(4;11)-Translokation aufwiesen, wurde mRNA isoliert und die Transkription, bzw. die Reprimierung der Zielgene durch RT-PCR-Experimente überprüft. Die Analyse beschränkte sich auf 13 der von NANOG1 normalerweise induzierten und 6 der reprimierten Gene (siehe Abb. 3.2). In allen Patienten konnten ein *NANOG*-Amplifikat identifiziert werden.



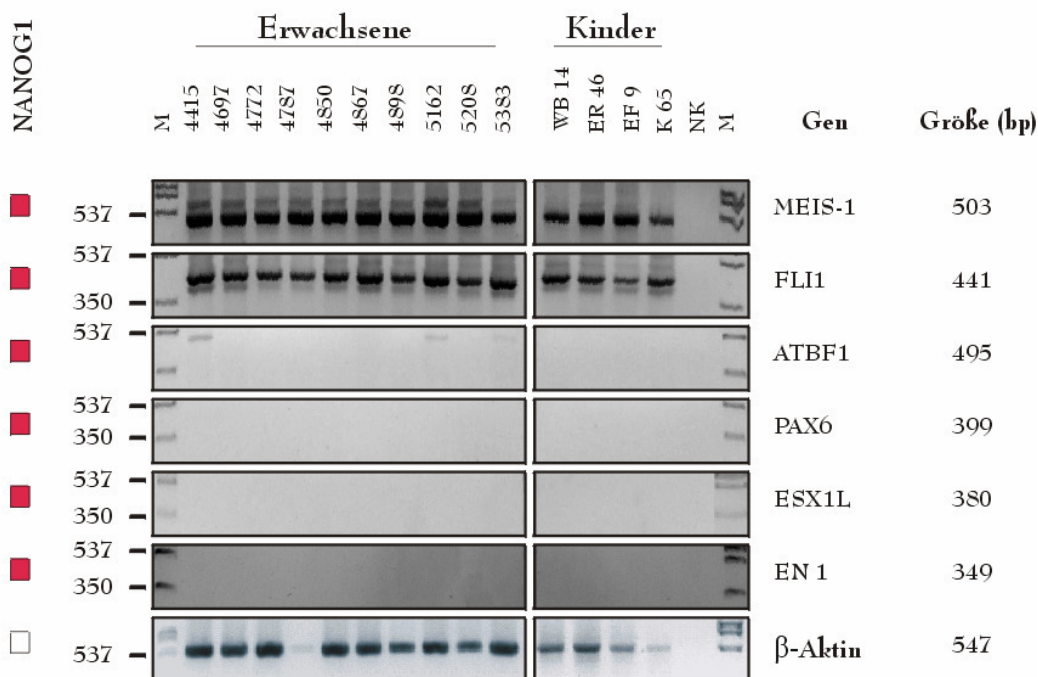


Abb. 3.2: RT-PCR auf Transkripte der NANOG1-Zielgene.

Gene, deren Transkription von NANOG1/OCT4/SOX2 induziert, unbeeinflusst bzw. inhibiert werden, sind durch ein grünes, leeres bzw. rotes Quadrat gekennzeichnet. Gezeigt ist die Transkription dieser Gene in peripheren Blutproben aus 10 Erwachsenen und 4 Kindern mit t(4;11)-Leukämie. β -Aktin diente als Positiv- bzw. Bezugskontrolle. **M**: λ -ClaI-Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp**: die erwarteten Basenpaargrößen.

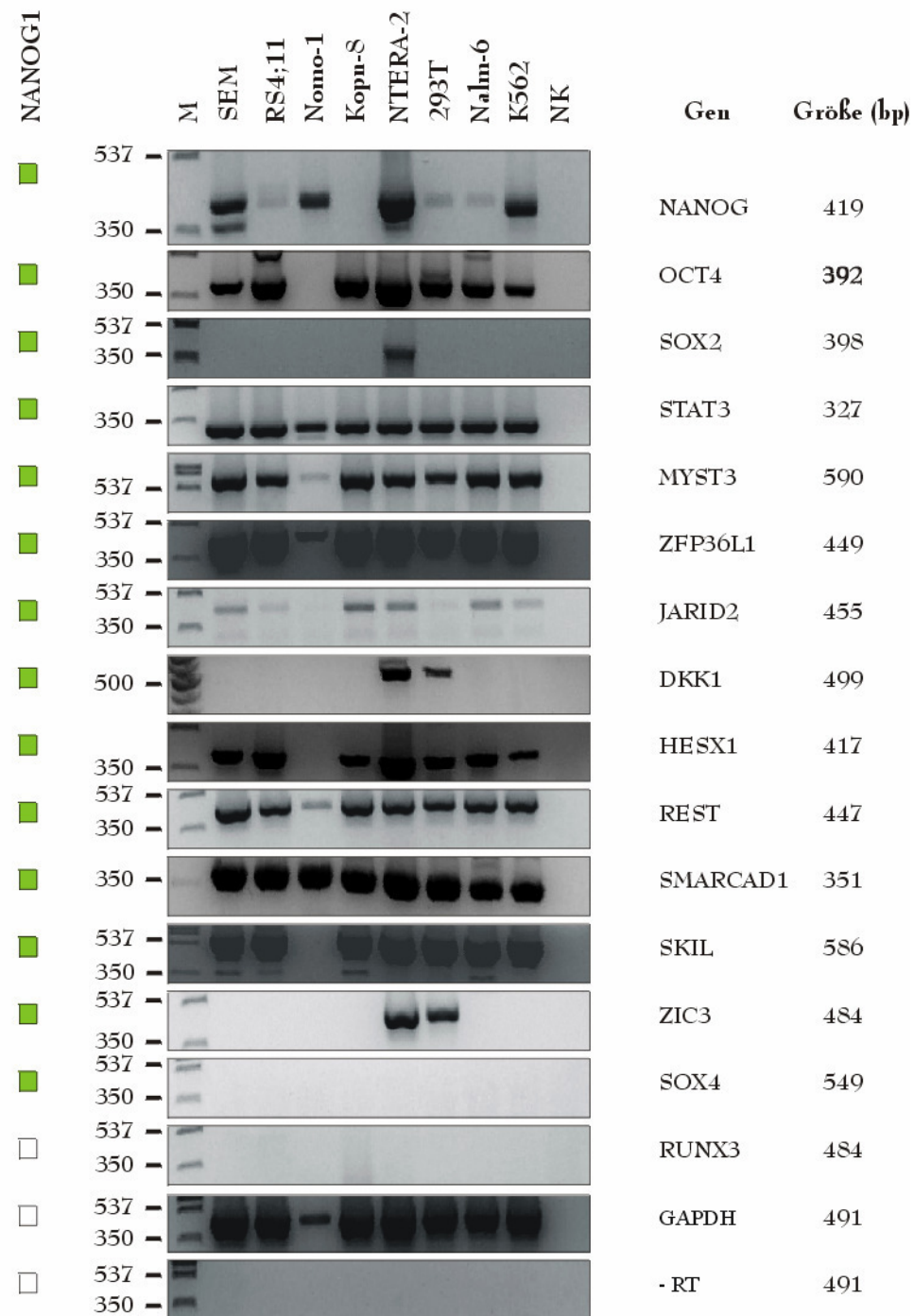
Bei der Analyse der Zielgene zeigten sich 10 von 13 der induzierbaren Gene in den Patientenproben tatsächlich transkriptionell aktiv, während 4 von 6 der reprimierenden Gene tatsächlich transkriptionell gehemmt vorlagen. Die Ausnahmen bei allen Patientenproben waren die Gene *ZIC3*, *MEIS1*, *FLI1* und *SOX2*. Während *SOX2* und *ZIC3* von NANOG1 normalerweise positiv reguliert werden, konnte selbst nach Herstellung zusätzlicher Oligonukleotide kein Transkript von diesen Genen nachgewiesen werden. Die eigentlich von NANOG1 reprimierten Gene *MEIS1* und *FLI1* waren dagegen in allen Patientenproben transkriptionell aktiv.

3.1.3 Transkriptionsanalyse der NANOG1-Zielgene in humanen Zelllinien

Die RT-PCR-Untersuchungen wurden ebenfalls an cDNA unterschiedlicher humaner Zelllinien durchgeführt (siehe Abb. 3.3). Zu den untersuchten Zelllinien zählten u.a. Zellpopulationen mit *MLL*-Translokationen, wie z.B. die t(4;11)-Zelllinien SEM und RS4;11. Weitere Zelllinien mit einer *MLL*-Translokation waren Kopn-8 mit einer t(11;19)-Translokation und Nomo-1 mit einer t(9;11)-Translokation. Es wurden aber auch andere humane Zelllinien, wie z. B. die embryonale Nierenzelllinie HEK-293T (293T), die B-Vorläuferzelllinie Nalm-6, die K562-Zelllinie und die NANOG1-exprimierende NTERA-2-Zelllinie analysiert.

In diesen Analysen wurden das *NANOG1*-Gen und 17 von den normalerweise *NANOG1*-reprimierten und 14 von den *NANOG1*-induzierten Genen in den RT-PCR-Experimenten überprüft. In allen Zelllinien wurden *NANOG*-Amplifikate nachgewiesen. Außerdem waren 10 von 17 der untersuchten normalerweise von *NANOG1*-reprimierten Gene in Zelllinien mit einer *MLL*-Translokation tatsächlich reprimiert, während 10 von 14 der *NANOG1*-induzierten Gene aktiv transkribiert wurden. Einige dieser reprimierten Gene, wie z. B. *FoxA2* oder *DLX5* wurden erstaunlicherweise auch in der Zelllinie NTERA-2 transkribiert, die alle drei Stammzellproteine exprimiert. Erneut zeigten sich die von *NANOG1*-reprimierten Gene *MEIS1* und *FLII* in *MLL*-Translokationszellen transkriptionell aktiv und die von *NANOG1*-induzierbaren Gene *SOX2*, *ZIC3* und *SOX4* transkriptionell inaktiv. Im Gegensatz zu biopsierten Patientenzellen transkribierten die Zelllinien auch kein *DKK1*, welches positiv von *NANOG1* reguliert wird. Nur in der Kontrollzelllinie NTERA-2 und in der HEK-293T-Zelllinie (293T) wurden Transkripte der Gene *SOX2*, *DKK1* und *ZIC3* nachgewiesen.

Weitere Zelllinien wiesen erhebliche Unterschiede in ihrem Transkriptionsprofil auf. Die Zelllinie Nalm-6 hatte 10 von 14 der *NANOG1*-induzierbaren Gene transkribiert und 12 von 17 der *NANOG1*-reprimierenden Gene waren inhibiert. Die in anderen Zelllinien transkribierten Gene *MEIS1* und *NFIX* lagen in Nalm-6 tatsächlich inhibiert vor, wobei die Gene *DACH1* und *NR4A2*, die eigentlich stumm sein sollten, in dieser Zelllinie induziert waren. Die K562 Zelllinie zeigte viele Gemeinsamkeiten zu HEK-293T auf. Das von allen anderen Zelllinien transkribierte Gen *FLII* war z. B. einzig in K562- und HEK-293T-Zellen transkriptionell reprimiert.



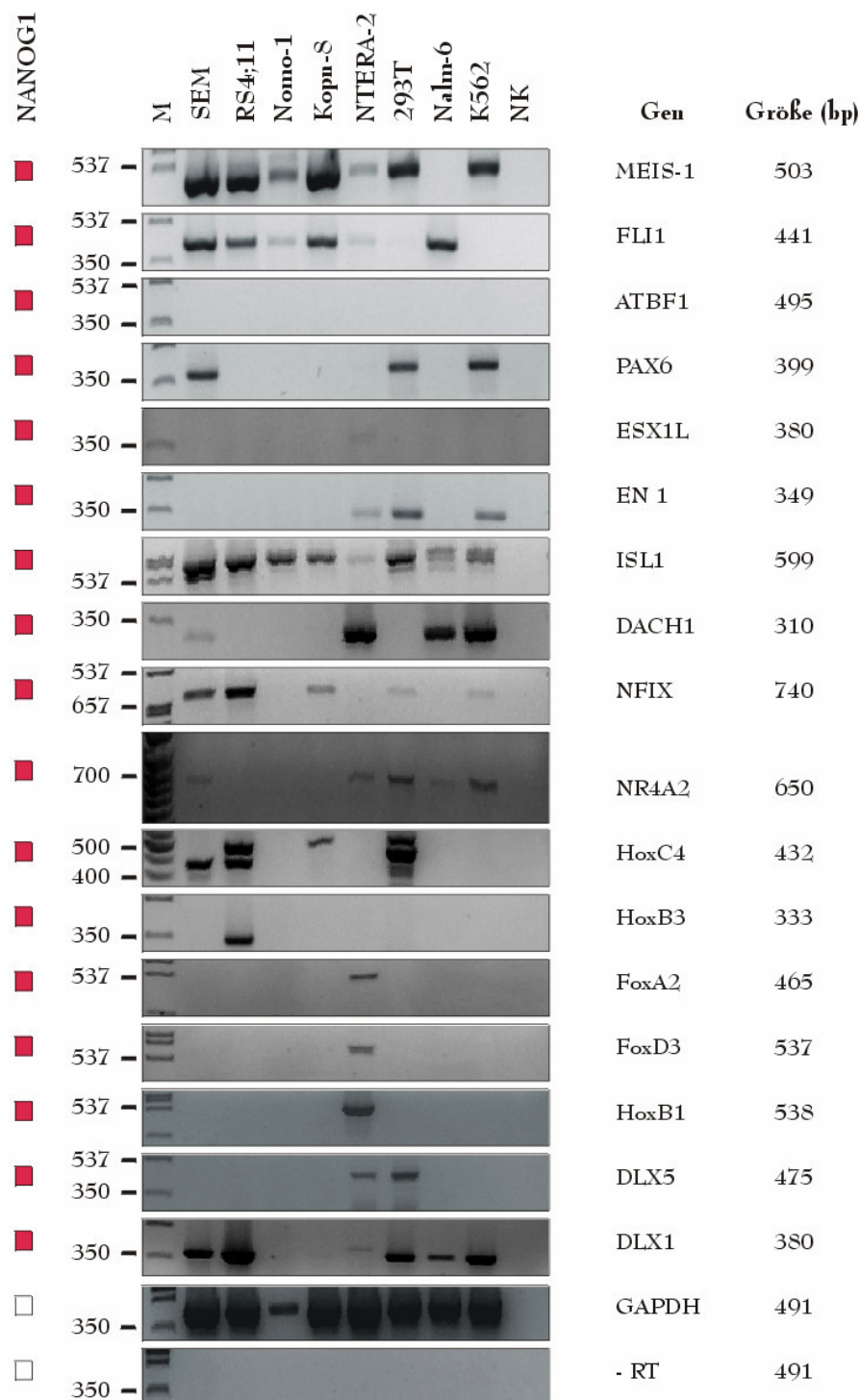


Abb. 3.3: RT-PCR auf Transkripte von Genen, die von NANOG1 reguliert werden.

Gene, deren Transkription durch NANOG1 induziert, unbeeinflusst bzw. inhibiert werden, sind durch ein grünes, leeres bzw. rotes Quadrat gekennzeichnet. Gezeigt ist die Transkription dieser Gene aus 8 unterschiedlichen Zelllinien. GAPDH diente als Positiv- bzw. Bezugskontrolle. **M**: λ -ClaI-Marker und 50 bp Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **-RT**: Überprüfung der RNA auf Kontamination mit GAPDH Oligonukleotiden, **bp**: die erwarteten Basenpaargrößen.

3.1.4 Transkriptionsanalyse der NANOG1-Zielgene in gesunden Probanden

Einige der NANOG1-Zielgene wurden auch in gesunden Probanden auf ihre Transkription hin überprüft. Dafür wurde peripheres Blut von drei Versuchspersonen entnommen und eine RT-PCR-Analyse mit ihrer RNA durchgeführt.

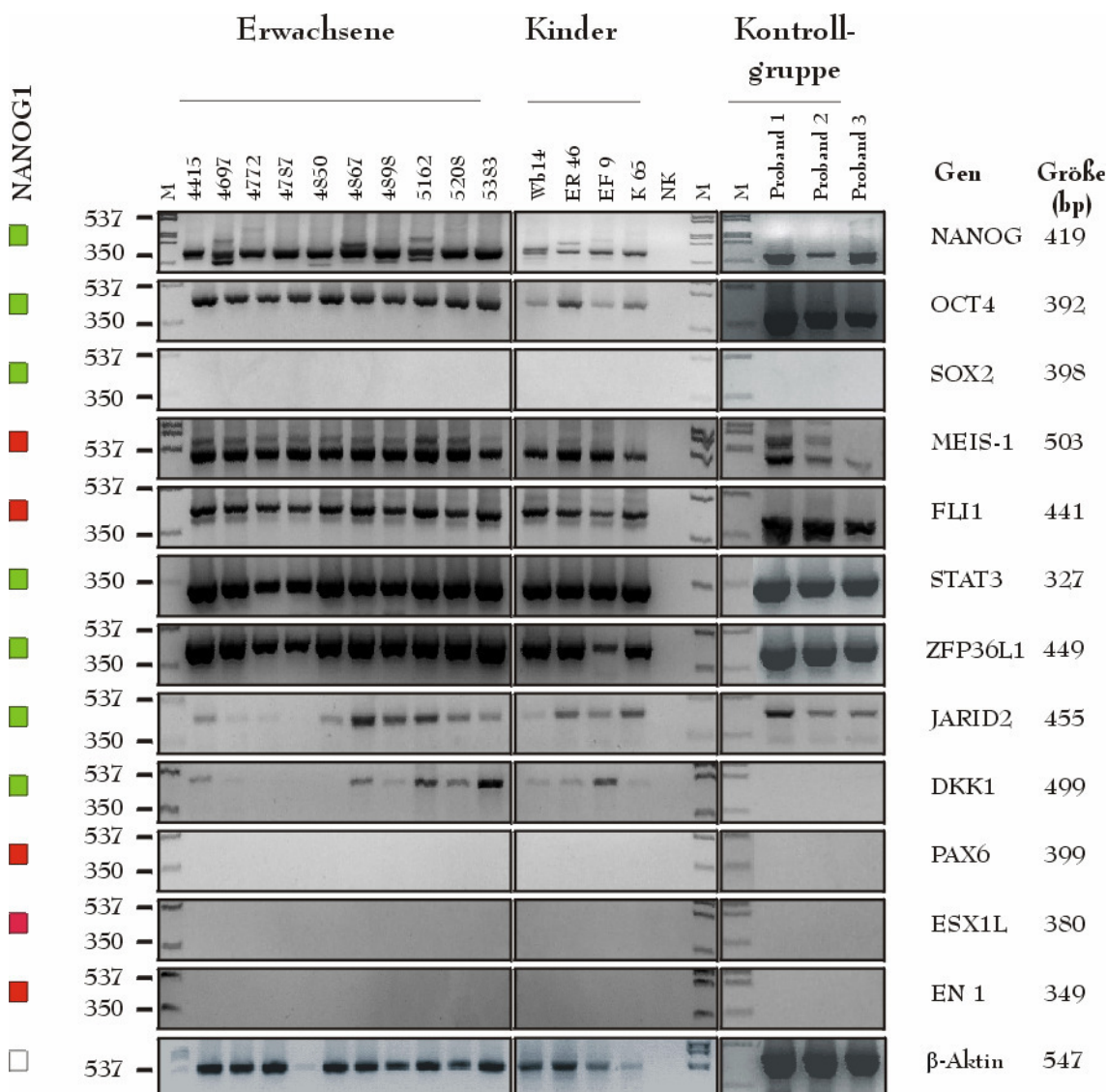


Abb. 3.4: RT-PCR auf Transkripte von Genen in ALL-Patienten und gesunden Probanden, die von NANOG1 reguliert werden.

Gene, deren Transkription durch NANOG1 induziert, unbeeinflusst bzw. inhibiert werden, sind durch ein grünes, leeres bzw. rotes Quadrat unter dem Faktor gekennzeichnet. Gezeigt ist die Transkription dieser Gene aus 14 Blutproben (peripheres Blut) von t(4;11)-Patienten und 3 gesunden Probanden. Beta-Aktin/GAPDH diente als Positiv- bzw. Bezugskontrolle. Im Falle von den t(4;11)-Patienten wurde die Transkription auf β-Aktin und im Falle von den Probanden auf GAPDH bezogen. **M:** λ-ClaI-Marker, **NK:** Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp:** die erwarteten Basenpaargrößen.

Die dabei resultierenden Ergebnisse sind zusammen mit den Ergebnissen aus RT-PCR-Versuchen mit t(4;11)-Patientenmaterial in Abbildung 3.4 dargestellt.

Alle von NANOG1 positiv-regulierten Gene, wie z.B. *OCT4*, *STAT3*, *ZFP36L1* wurden sowohl in den Patienten- als auch in den gesunden Probandenblutproben aktiv transkribiert. Die von NANOG1 negativ-regulierten Gene *PAX6*, *ESX1L* und *EN1* wurden auch in den gesunden Probanden nicht transkribiert. Die Ausnahmen sowohl in den Probanden als auch in den t(4;11)-Patienten stellten erneut die Gene *SOX2*, *FLII* und *MEIS1* dar, die entsprechend den vorherigen Resultaten im Fall von *FLII* und *MEIS1* transkribiert und im Fall von *SOX2* inaktiv vorlagen. Eine Ausnahme war das von NANOG1 positiv-regulierte Gen *DKKI*, welches in den t(4;11)-Patienten aber nicht in den gesunden Probanden aktiv transkribiert wurde.

In peripheren Blutzellen der t(4;11)-Patienten und der gesunden Probanden scheinen einige der über NANOG1 regulierten Gene entsprechend dem Stammzellprogramm kontrolliert zu werden, obwohl die untersuchten Zellen adulten Zellpopulationen entnommen sind. Diese Resultate sprechen demnach für eine Existenz stammzellähnlicher Zellen in adulten Zellpopulationen und die Regulation dieser Zellen über NANOG1 oder anderer Stammzellfaktoren, die möglicherweise ein ES-ähnliches Programm aktivieren.

3.2 Charakterisierung der regulatorischen Regionen vor den NANOG-Genen

3.2.1 Überprüfung der NANOG-Gentranskription in humanen Zelllinien mit MLL-Translokation

Das bisherige Problem in der *NANOG*-Analyse bestand darin, zwischen *NANOG1* und seinen Pseudo-/Retrogenen zu unterscheiden. Bislang wurden die Pseudo-/Retrogene zwar als angeblich nicht transkribierbare Gene aus der Analyse ausgeschlossen, jedoch konnten Transkripte mehrerer Pseudo-/Retrogene in Tumorzellen erfolgreich nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2006). Die meisten der 11 Pseudo-/Retrogene von *NANOG1* weisen aufgrund evolutionärer Ansammlung von Stop-Codons, Punktmutationen und

Leserahmenverschiebungen keinerlei Funktion mehr auf. Die einzigen beiden Genkopien mit funktionalen offenen Leserahmen sind *NANOG2* und *NANOGP8*.

Zur Klärung, inwieweit andere Pseudo-/Retrogene in untersuchten Zelllinien aktiv transkribiert vorlagen und damit ebenfalls amplifizierbar waren, wurden drei unterschiedliche Oligonukleotidsätze entworfen und anschließend in RT-PCR-Experimenten verwendet. Das Oligonukleotidpaar A umfasste den gesamten offenen Leserahmen von *NANOG1*, während das Oligonukleotidpaar B nur die Hälfte der kodierenden *NANOG1*-Sequenz amplifizierte und das Primerpaar C lag mit dem 5' Oligonukleotid außerhalb des offenen Leserahmens, nämlich im 5'UTR-Bereich von *NANOG1* (siehe Abb. 3.5 A). Im Gegensatz zum letzten Primerpaar, welches nur *NANOG1* detektierte, konnten die ersten beiden Oligonukleotidpaare auch die Sequenzen von *NANOG2* und der Pseudo-/Retrogene amplifizieren.

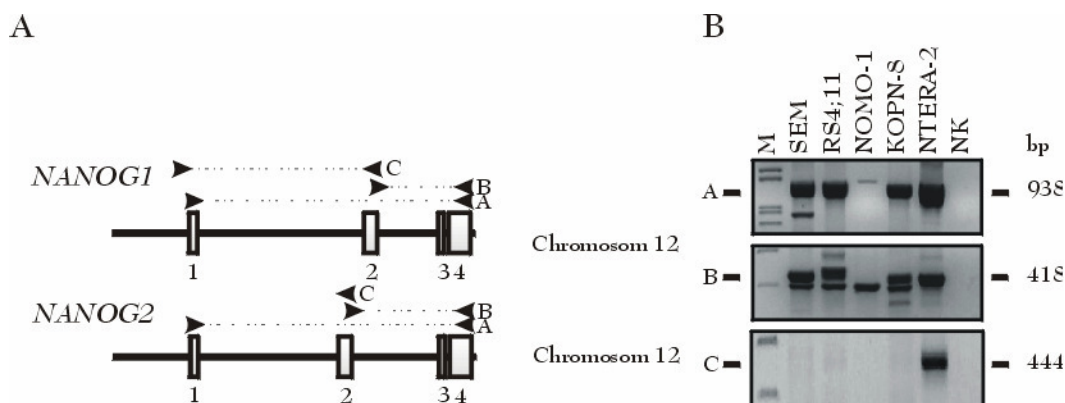


Abb. 3.5: Nachweis der *NANOG1*- bzw. *NANOG2*- oder der Pseudo-/Retrogen-Transkripte in den Zelllinien SEM, RS4;11, Nomo-1, Kopn-8 und NTERA-2.

Die in (A) gezeigten Primerpaare A, B und C wurden auf die RNA der Zelllinien (B) angewandt, um die Transkription von *NANOG1* zu überprüfen. Das Primerpaar A bindet an alle Transkripte, die das 1. und das 4. Exon haben. Primerpaar B bindet im 3. und 4. Exon und detektiert somit auch kürzere Produkte, die das erste Exon nicht besitzen. Das Primerpaar C bindet in der 5'UTR von *NANOG1*. **NK**: Wasserkontrolle, **M**: λ-ClaI-Marker, **bp**: die erwarteten Basenpaargrößen.

Mit Hilfe der Oligonukleotidsätze A und B konnte in jeder untersuchten Zelllinie Amplifikate hergestellt werden, das Oligonukleotidpaar C detektierte hingegen nur in der positiven Kontrollzelllinie NTERA-2 ein entsprechendes Transkript.

In allen Zelllinien außer NTERA-2 waren demnach keine *NANOG1*-, aber Transkripte von *NANOG2* oder der Pseudo-/Retrogene nachgewiesen worden.

3.2.2 Überprüfung der *NANOG2*- und *NANOGP8*-Transkription

Viele der Genkopien besitzen aufgrund der vielen Mutationen oft nur verkürzte oder gar keine offenen Leserahmen mehr, wodurch sie nicht in Protein translatiert werden können.

Nur das Genduplikat *NANOG2* und das Retrogen *NANOGP8* besitzen einen offenen Leserahmen und können in ein funktionales Protein translatiert werden. Deshalb wurden diese beiden Gene genauer untersucht.

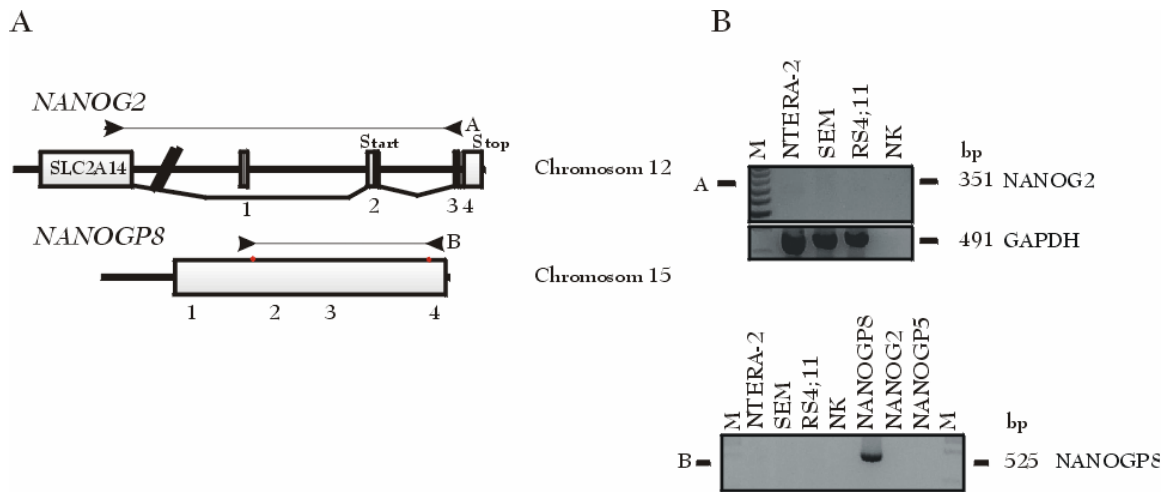


Abb. 3.6: Lage der zur Detektion von *NANOG2* und *NANOGP8* verwendeten Oligonukleotide (A) und Überprüfung der Transkription dieser Genkopien in unterschiedlichen Zelllinien mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten (B).

(A): Darstellung der publizierten Genstruktur von *NANOG2* (Hart *et al.*, 2004) und *NANOGP8*. Die verwendeten Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt. (B): Die Transkription dieser Genkopien wurde in den Zelllinien SEM, RS4;11 und NTERA-2 mittels RT-PCR-Experimenten analysiert. Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung diente im Falle von *NANOGP8* ein *NANOGP8*-Vektor als Positivkontrolle. Außerdem wurden Plasmide mit *NANOG2*- und *NANOGP5*-Sequenzen zur Ausschließung jeglicher Kreuzreaktionen der Oligonukleotide mit diesen Genkopien verwendet. Die erwarteten Größen sind 351 bp bei *NANOG2* und 525 bp bei *NANOGP8*. M: λ -ClaI-Marker und 50 bp Marker, NK: Wasserkontrolle, bp: Basenpaare.

Die RT-PCR-Analyse beider Gene erfolgte an den beiden t(4;11)-Zelllinien SEM und RS4;11 und der embryonalen NTERA-2-Zelllinie mit Hilfe der *NANOG2*- und *NANOGP8*-spezifischen Oligonukleotide. Eine Kreuzreaktion der verwendeten *NANOGP8*-Oligonukleotide konnte dabei durch die Verwendung von *NANOG2*- und *NANOGP5*-Kontrollvektoren ausgeschlossen werden. Im Falle von *NANOG2* wurde ein Oligonukleotid verwendet, welches in der von Hart *et al.* beschriebener Sequenz im *SLC2A14*-Gen bindet (Hart *et al.*, 2004). Dieses Gen befindet sich 19580 bp oberhalb von

Exon 1 des *NANOG2*-Gens und spleißt angeblich direkt zum Exon 2 des *NANOG2*-Gens. Da das Exon 2 ein *bona fide* Start-Codon besitzt, würde der offene Leserahmen demnach vom Start-Codon im Exon 2 bis zum Stop-Codon im Exon 4 reichen. (siehe Abb. 3.6 A). In keiner der untersuchten Zelllinien konnte jedoch ein Transkriptionsprodukt von *NANOG2* oder von *NANOGP8* nachgewiesen werden, obwohl genügend cDNA eingesetzt wurde. Außerdem waren die PCR-Bedingungen zumindest in der *NANOGP8*-PCR für eine Amplifikation optimal, da das *NANOGP8*-Plasmid ein Amplifikat zeigte.

3.2.3 Sequenzierung von *NANOG*-Transkripten aus der t(4;11) Zelllinie SEM

Parallel wurden die aus der SEM-Zelllinie gewonnenen cDNA-Amplimere in den pCR[®]4-TOPO[®] kloniert, in *E. coli* transformiert und 60 Klone mittels Sequenzierung charakterisiert.

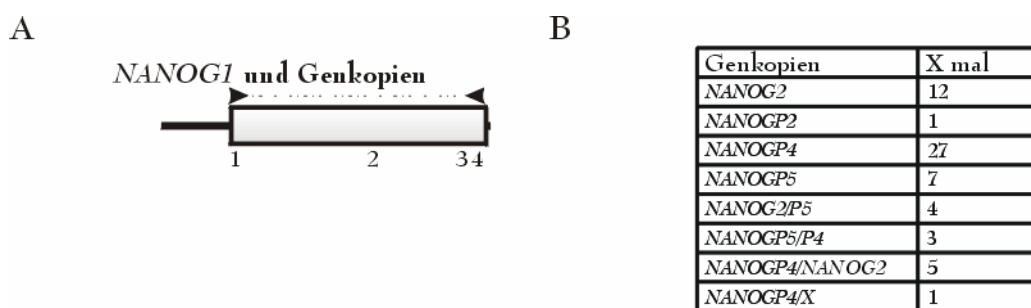


Abb. 3.7: Darstellung der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der in t(4;11) SEM-Zellen vorliegenden *NANOG*-Transkripte (A) und detaillierte Beschreibung der gefundenen *NANOG*-Transkripte (B).

(A): Dargestellt ist die *NANOG*-cDNA, an die die Oligonukleotide am ersten und letzten Exon binden und somit den gesamten offenen Leserahmen abgreifen. (B): Die Transkripte der SEM-Zellen, die sequenziert wurden, gehörten zu *NANOG2* (12 mal gefunden), *NANOGP2* (1 mal gefunden), *NANOGP4* (27 mal gefunden) und *NANOGP5* (7 mal gefunden).

Etwa 20% der untersuchten Amplifikate waren Transkripte von *NANOG2*, 2% von *NANOGP2*, 45% von *NANOGP4* und 12% von *NANOGP5*. Ein kleiner Teil der untersuchten Amplifikate konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, da die Sequenz die typischen Mutationen von verschiedenen Pseudo-/Retrogenen enthielten. Die t(4;11)-Zelllinie SEM transkribierte demnach *NANOG2*, welches in dem spezifischen *NANOG2*-RT-PCR-Experiment jedoch nicht detektiert wurde.

3.2.4 Analyse des 5'Endes der *NANOG2*-Transkripte

Mit den von Hart *et al.* empfohlenen Oligonukleotiden konnte kein *NANOG2*-Transkript nachgewiesen werden. Die durch Sequenzierung eindeutig als *NANOG2* identifizierten Transkripte enthielten außerdem entgegen der von Hart *et al.* beschriebener Information ihr Exon 1. Folglich sollte das 5'Ende der *NANOG2*-Transkripte in den beiden Zelllinien NTERA-2 und SEM charakterisiert werden. NTERA-2 wurde als positive Kontrolle für *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkription verwendet.

Die RNA beider Zelllinien wurde mit der 5'RACE-Methode zunächst in cDNA überschrieben und anschließend wurde nur die *NANOG*-cDNA mit spezifischen Oligonukleotiden, die im Exon 3 und 4 binden, in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert. Die resultierenden Banden wurden aus dem Gel isoliert und in den pCR[®]4-TOPO[®] kloniert.

Die einzelnen Klone wurden anschließend sequenziert und mit der gDNA-Sequenz der *NANOG1*- und *NANOG2*-Gene verglichen. Unbekannte Sequenzen wurden mit Hilfe der Datenbank BLAST auf ihre Herkunft hin überprüft.

Die Sequenzierung der 5'RACE-Amplifikate ermöglichte die Zuordnung aller identifizierten Sequenzen zu den beiden Genen *NANOG1* und *NANOG2*.

Die Banden Ia, b und II konnten nur in der NTERA-2-Probe detektiert werden (siehe Abb. 3.8 A). Aus den Ia und Ib-Gelbanden wurden *NANOG1*- und zudem *NANOG2*-Transkripte isoliert, die mit der 5'UTR begannen. In der Bande II konnten *NANOG1*-Transkripte mit zwei neuen 5'Exons nachgewiesen werden. Die beiden neuen 127 bp und 156 bp große Exons liegen ca. 1,7 kb bzw. 1,0 kb oberhalb vom bisherigen ersten Exon des *NANOG1*-Gens. Aufgrund der neuen Exons wurde die Nomenklatur von *NANOG1* und *NANOG2* verändert. Die bisherigen Exons 1-4 wurden in Exon 3-6 umbenannt.

Die Bande IIIa konnte sowohl in den NTERA-2- als auch in den SEM-Zellen detektiert werden. Die Sequenzierung ergab ein *NANOG2*-Transkript mit einem neuen Exon vor dem bisherigen Exon 1 (siehe Abb. 3.8 B). Dieses 127 bp große Exon liegt ebenfalls 1,7 kb vor dem bisherigen Exon 1 von *NANOG2* und ist identisch mit dem 1,7 kb entfernten Exon des *NANOG1*-Gens. Beim Spleißen von diesen neuen Exons verliert das bisherige Exon 1 (jetzt Exon 3) sowohl bei *NANOG1* als auch bei *NANOG2* entweder 2, 5 oder 16 Nukleotide.

Bereits 2004 identifizierten Booth und Holland ein *NANOG2*-Transkript, in dem das vorherige Exon 1 eine 16 bp-Deletion aufwies und mit einer 1,7 kb aufwärts entfernten Sequenz gespleißt wurde. Diese Sequenz entspricht dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen neuen Exon 1. Das Transkript wurde jedoch in der Studie von Booth und Holland nicht weiter untersucht.

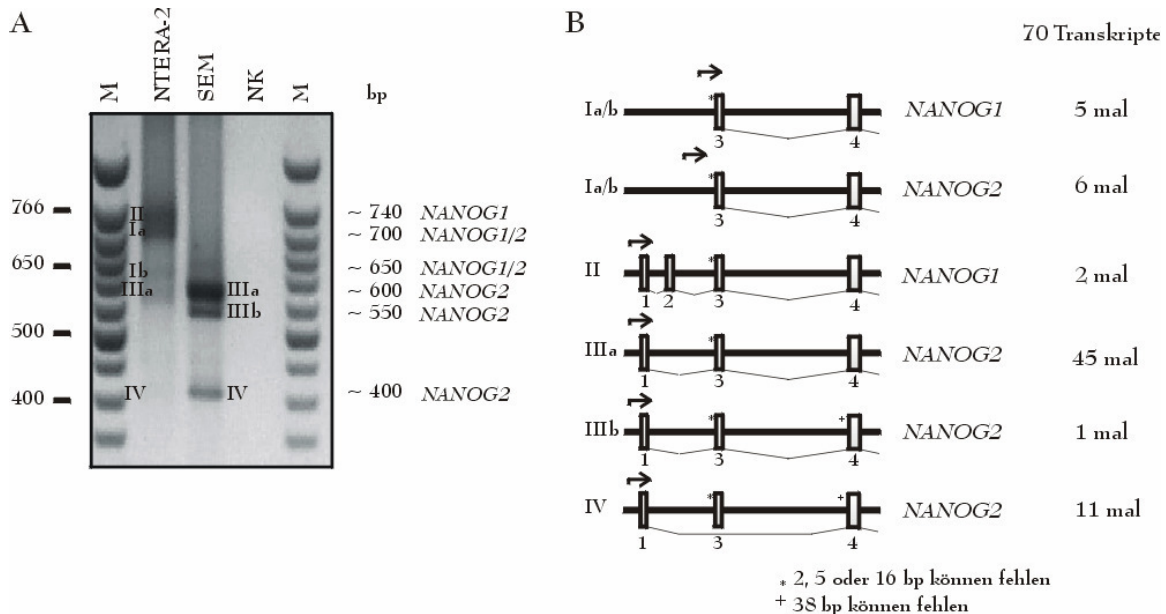


Abb. 3.8: Darstellung der durch die 5'RACE-Methode produzierten Banden und der sequenzierten Spleißvarianten.

(A) Mit Hilfe des 5'RACE-Experiments konnten in beiden Zelllinien NTERA-2 und SEM die mit I-IV bezeichneten Banden detektiert werden, die nach Sequenzierung die Erstellung der neuen *NANOG1*- und *NANOG2*-alternativen Spleißvarianten ermöglichten. (B) Der *NANOG1*- und der *NANOG2*-Varianten können durch einen alternativen Spleißprozess im ehemals 1. Exon 2, 5 oder 16 bp fehlen, was durch einen Stern (*) gekennzeichnet ist. Der *NANOG2*-Variante, die aus der Bande IIIb isoliert wurde, fehlen 38 bp im Exon 4, was durch ein Plus (+) gekennzeichnet ist. Die Pfeile markieren die möglichen Transkriptionsstartpunkte und die Anzahl der jeweiligen sequenzierten Transkripte ist angemerkt. M: 50 bp Marker, bp: Basenpaare, NK: Negativkontrolle.

In der SEM-Zelllinie wurde außerdem die Bande IIIb analysiert. Sie enthielt ebenfalls die Amplifikate von *NANOG2*-Transkripten mit dem neuen Exon 1. Die Transkripte hatten aber im Vergleich zu vorher beschriebenen Amplifikaten eine durch das alternative Spleißen hervorgerufene Deletion von 38 bp im Exon 4. Die kleinste in beiden Zelllinien amplifizierte Bande IV enthielt ebenfalls die Exon 1-enthaltende *NANOG2*-Sequenz, dessen Exon 1 aber unter Ausschluss von Exon 3 direkt zu Exon 4 spleißte.

Es konnte kein *NANOG2*-Transkript gefunden werden, welches auch das zweite neue Exon von *NANOG1* aufweist. Ein Sequenzvergleich der genomischen Sequenz von

NANOG1 und *NANOG2* zeigte, dass das Exon 2 von *NANOG1* durch einen Rekombinationsprozess im *NANOG2*-Gen während der Evolution deletiert wurde.

In weiteren 5'RACE- und RT-PCR-Experimenten konnten zusätzliche 5'-Exons identifiziert werden. Eines der Exons liegt 64 bp aufwärts von Exon 1 von *NANOG1* und spleißt unabhängig von diesem zu Exon 2. Eine weitere Alternative besteht aus Exon 1 und 161 Nukleotiden vom Intron 1, die dann zu Exon 2 spleißen. Da das *NANOG1*-Transkript drei alternative erste Exons haben kann, wurden diese mit 1a-c benannt. Die etwas seltener benutzten Exons 1a und 1c wurden daher in der Abbildung 3.9 grau markiert.

Mit Hilfe des 5'RACE-Experiments konnte für *NANOG2* nicht gezeigt werden, ob es ebenfalls die drei unterschiedlichen Exon 1-Transkriptionsstartpunkte benutzt. Ein Sequenzvergleich der beiden Gene zeigte, dass eine Exon 1a-homologe Sequenz auch im *NANOG2*-Gen vorliegt und dementsprechend benutzt werden könnte.

Eine RT-PCR-Analyse detektierte in der Zelllinie Nomo-1 ein Transkript, welches nach Sequenzierung als *NANOG2* identifiziert wurde und welches das alternative Exon1c* enthielt. Dieses 319 bp große Exon, das 1,5 kbp vor Exon 3 liegt, spleißt zu einer internen Spleißstelle in Exon 3, wodurch das Exon 3 die ersten 79 bp verliert. Sowohl das Exon 1b als auch das Exon 1c* werden für die Transkription häufig benutzt.

Da sehr viele unterschiedliche alternative Spleißvarianten identifiziert wurden, wurden diese mit A-F benannt (siehe Abb. 3.9). Dabei wurden die für den gleichen offenen Leserahmen kodierenden Transkripte unter einem Buchstaben zusammengefasst. Die Transkriptvariante *NANOG1* A kodiert dabei für das bisher bekannte Protein NANOG1.

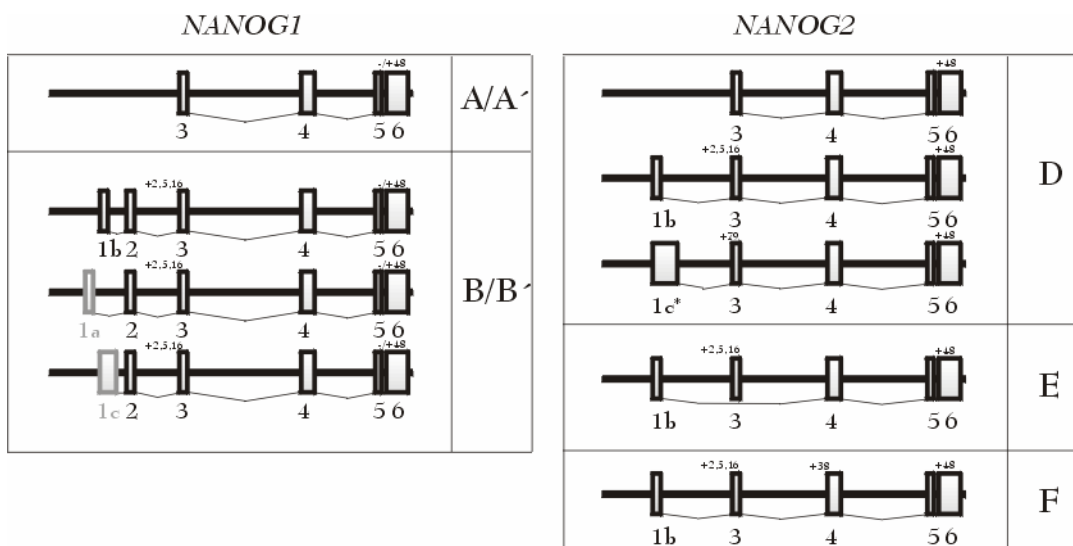
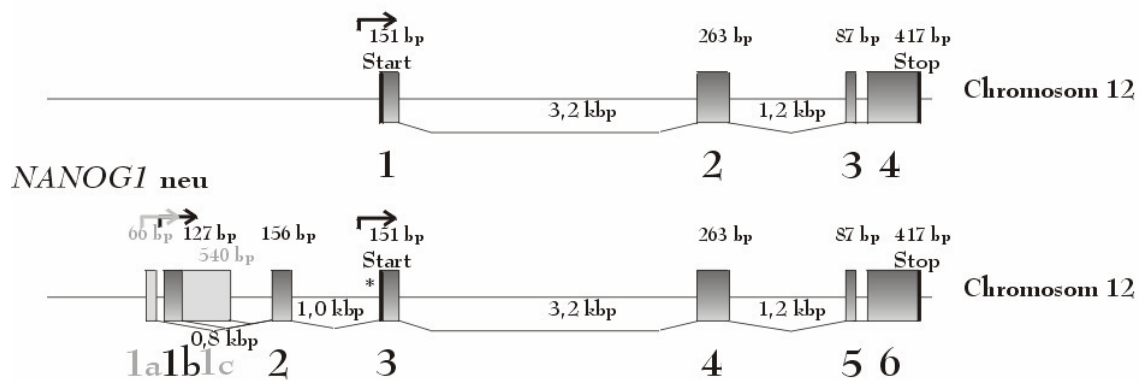
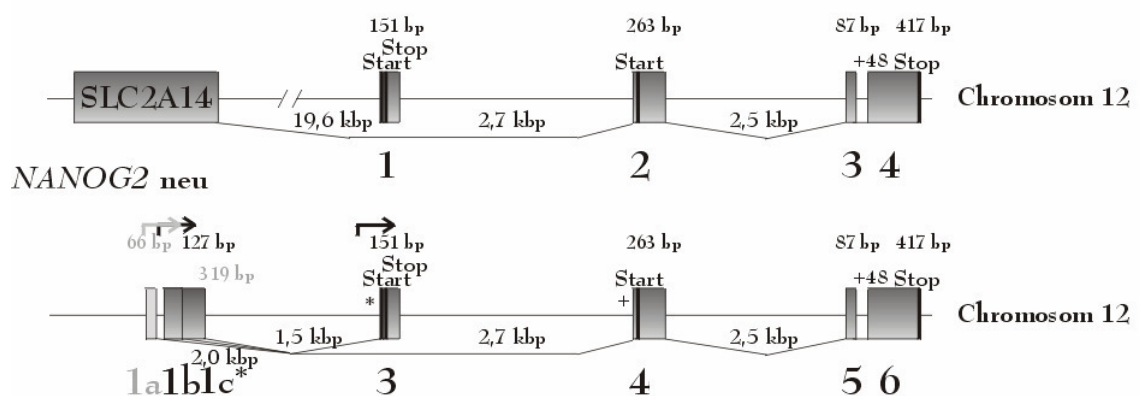


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der in NTERA-2 und SEM gefundenen *NANOG1*- und *NANOG2*-Gentranskripte.

Die alternativen Spleißvarianten von *NANOG1* und *NANOG2*, die für die gleiche Proteinvariante kodieren, sind unter einem Buchstaben zusammengefasst. Das bisher in der Literatur beschriebene NANOG1-Protein wird von dem Transkript *NANOG1 A* kodiert. Da die *NANOG1*-Transkripte eine Deletion von 48 bp im Exon 6 aufweisen können, sind deren Produkte durch einen Apostroph gekennzeichnet. Die über den Exons markierten Zahlen stehen für die fehlenden Basenpaare in den jeweiligen Exons. Im Exon 3 können 2, 5 oder 16 bp fehlen. In einer der *NANOG2*-Variante, bei der Exon 1c* zu Exon 3 spleißt, fehlen 79 bp im Exon 3.

Zur Unterscheidung der von uns entdeckten Daten und der bisherigen bekannten Kenntnisse wurden die Gene von *NANOG1* und *NANOG2* in Abbildung 3.10 noch einmal zusammen abgebildet.

NANOG1 alt*NANOG2* alt

+38 bp können fehlen
 *2, 5, 16 oder 79 bp können fehlen

Abb. 3.10: Schematische Darstellung der neuen Genstrukturen von *NANOG1* und *NANOG2*.

Die neu identifizierten Exons liegen 1 kb und 1,7 kb vor dem ehemals ersten Exon des *NANOG1*-Gens, wodurch die Exon-Nomenklatur verändert wurde. Die bisherigen Exons 1-4 wurden in die Exons 3-6 umbenannt. Das *NANOG2*-Gen hat aufgrund der Insertion eines Alu-Elements das 2. Exon verloren. Die neuen Exons spleißen zu Exon 3 (*alias* 1) oder Exon 4 (*alias* 2). Beim Spleißen können im Exon 3 2, 5 oder 16 bp und im Exon 4 38 bp herausgespleißt werden, was durch einen Stern und ein Plus gekennzeichnet ist. Die alternativen ersten Exons sind als 1a-1c markiert und die beim alternativen Spleißen weniger benutzten Exons grau untermalt. Die Pfeile zeigen die möglichen Transkriptionsstartpunkte an. Die Größen der Exons bzw. Introns werden durch darüber bzw. darunter stehende Zahlen markiert. Die unter den Exons verlaufenden und die Exons verbindenden Linien beschreiben die alternativen Spleißmöglichkeiten. Die Start- und Stop-Codons sind durch schwarze im Exon senkrecht verlaufende Balken dargestellt.

3.2.5 Direkter Nachweis der *NANOG1/2*-Transkripte in Zelllinien

Zum direkten Nachweis der *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte wurden die spezifischen Primerpaare A und B (siehe Abb. 3.11 A) verwendet. Die Oligonukleotide vom Primerpaar A binden im Exon 1b/Exon 3 und vom Primerpaar B im Exon 2/Exon 3. Somit kann das Primerpaar A sowohl *NANOG1*- als auch *NANOG2*-Transkripte detektieren, das Primerpaar B detektiert hingegen nur *NANOG1*-Transkripte. Zur Darstellung der erfolgreichen Amplifikation wurden *NANOG1*- und *NANOG2*-cDNAs ebenfalls in den PCR-Experimenten angewandt.

Mit Hilfe der Oligonukleotide konnte für die NTERA-2-Zellen gezeigt werden, dass sie sowohl *NANOG1* als auch *NANOG2* transkribieren, während die t(4;11)-Zelllinie SEM ausschließlich das *NANOG2*-Gen transkribiert. Auch alle anderen untersuchten Zelllinien mit einer *MLL*-Translokation bildeten das *NANOG2*-Transkript. Außerdem konnte in den Zelllinien NTERA-2, Nomo-1 und Kopn-8 ein *NANOG2*-Transkript mit dem alternativen Exon 1c* nachgewiesen werden. Dieses Transkript läuft im Gel etwas tiefer als das *NANOG1*-Amplimer.

Die Untersuchung von verschiedenen RNA-Präparationen aus der gleichen Zelllinie zeigte aber, dass einige RNA-Aufreinigungen die *NANOG1*-Transkripte ebenfalls enthielten. Es wurden drei unterschiedliche RNA-Isolierungen aus den Zelllinien SEM, Nomo-1, Kopn-8 und zwei unterschiedliche RNA-Isolierungen aus der Zelllinie RS4;11 durchgeführt und die RNA untersucht.

Das *NANOG1*-Transkript konnte in einer RNA-Probe der RS4;11- und der Kopn-8-Zelllinie schwach nachgewiesen werden (markiert durch ein Kreuz).

Alle Amplifikate wurden sequenziert und wiesen die erwarteten Sequenzen auf. Die DNA-Menge der *NANOG1*-Bande in der RS4;11-Probe war jedoch für eine Sequenzierung zu gering.

Anhand der neu etablierten Genstrukturen für *NANOG1* und *NANOG2* wurden neue Primerkombinationen entworfen, die es zum ersten Mal erlauben, Transkripte von *NANOG1* und *NANOG2* selektiv zu amplifizieren (siehe Abb. 3.11 A). Damit ist es nun möglich, „echte“ *NANOG*-Transkripte von Pseudogen-Transkripten zu unterscheiden.

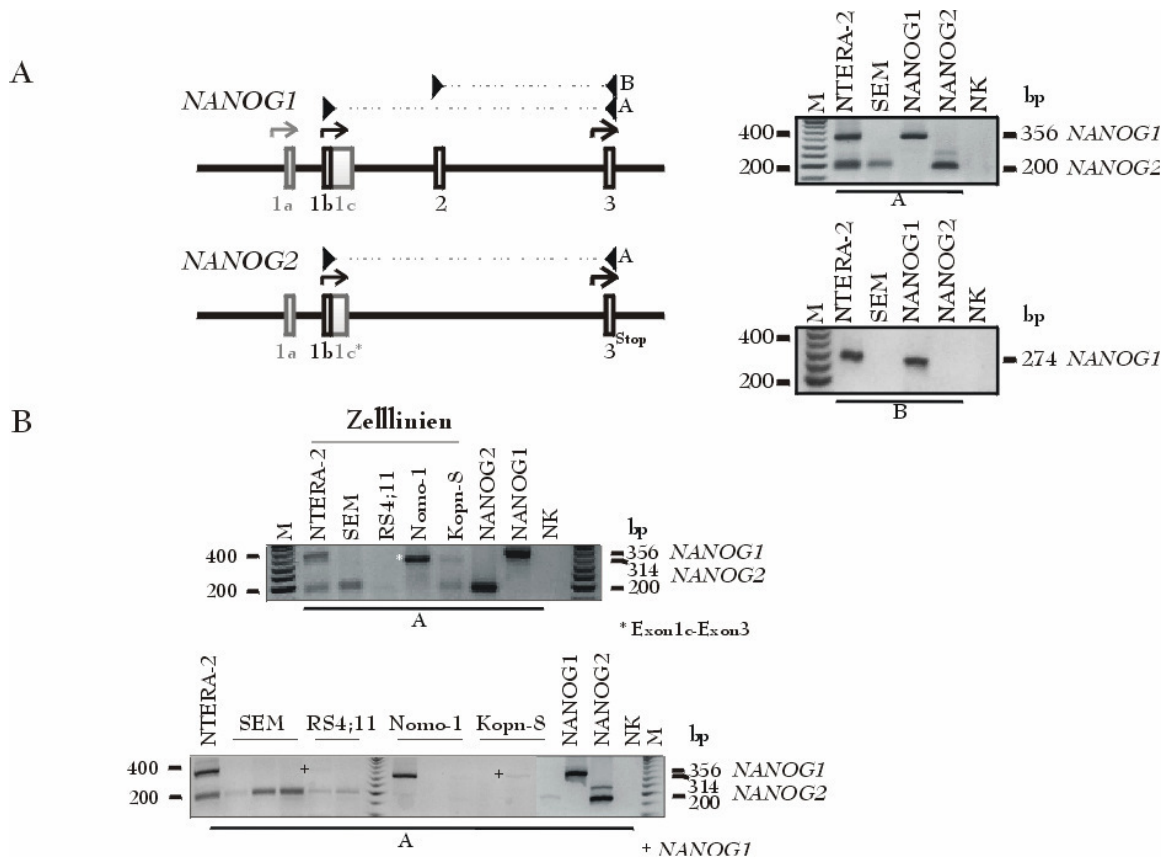


Abb. 3.11: Darstellung der verwendeten Oligonukleotidpaare für die RT-PCR-Analyse der neuen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte in unterschiedlichen Zelllinien.

(A): Darstellung der bei der RT-PCR-Experimenten verwendeten Oligonukleotide (Pfeile). Das Primerpaar A bindet sowohl an *NANOG1* als auch an *NANOG2*, das Primerpaar B nur an *NANOG1*. (B): Die Primerpaare wurden auf die cDNA der Zelllinien NTERA-2, SEM, RS4;11, Nomo-1 und Kopn-8 angewandt. Als positive Kontrollen für die Amplifikation dienten die cDNAs, die *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte enthielten. Die RNA der gleichen Zelllinie wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. M: 50 bp Marker, NK: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), bp: Basenpaare.

3.2.6 *NANOG1/2*-Nachweis in t(4;11)-Patientenzellen, AML-Patientenzellen und gesunden Probanden

Die RT-PCR-Analyse wurde ebenfalls mit der cDNA vom peripheren Blut aus 10 t(4;11)-Patienten und drei gesunden Probanden durchgeführt (siehe Abb. 3.12 A).

Von den 10 Patienten konnte bei 7 Patienten eine eindeutige *NANOG2*-Bande (200 bp) und das längere *NANOG2*-Amplimer mit dem Exon 1c* (314 bp) detektiert werden. Zwei der gesunden Probanden wiesen keine Amplimere in dieser Größenordnung auf. Nur beim gesunden Probanden Nr. 3 wurde eine sehr schwache *NANOG2*-Bande detektiert.

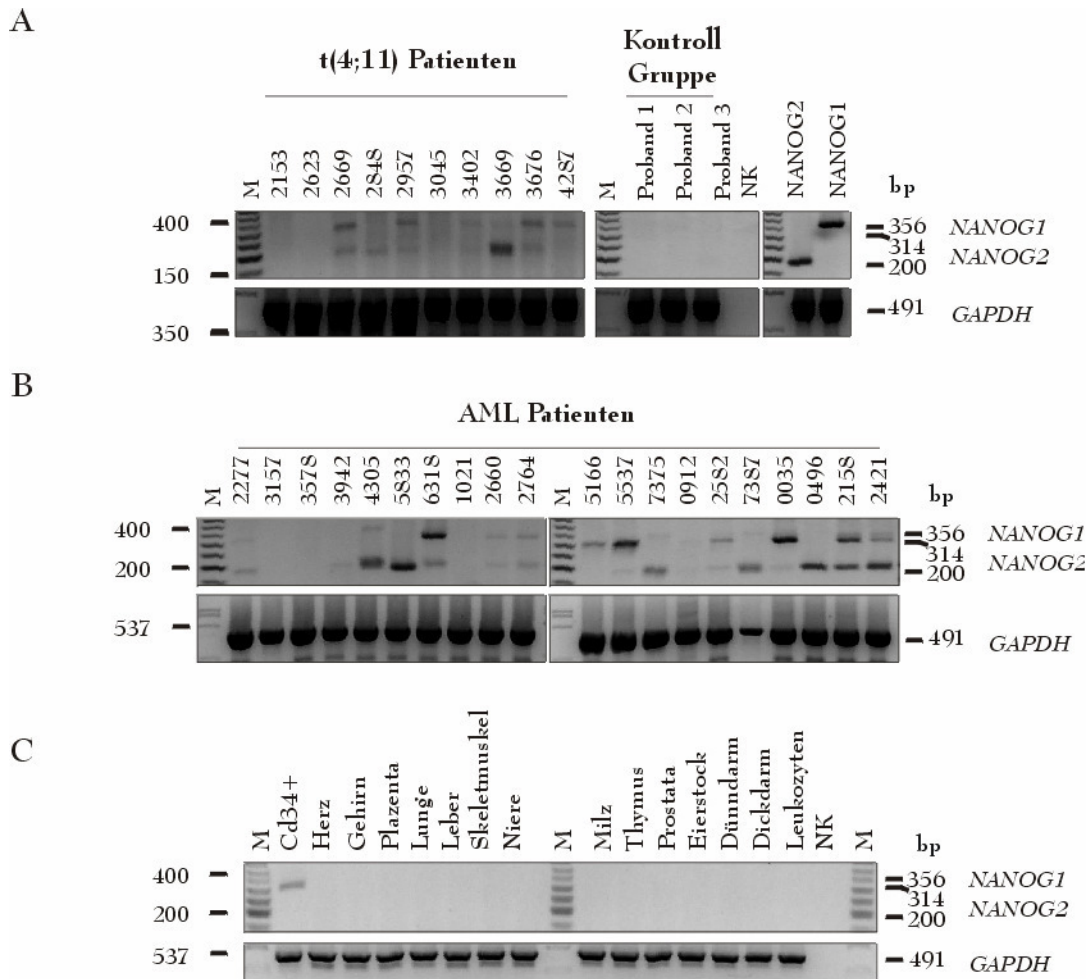


Abb. 3.12: RT-PCR-Analyse der neuen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte in ALL-, AML-Patienten, gesunden Probanden und humanen Zellgewebe.

(A): Das Primerpaar A wurde auf die cDNA von 10 ALL-Patienten und 3 gesunden Probanden (B) 20 AML-Patienten und (C) auf unterschiedliche Gewebe-cDNAs angewandt. Als positive Kontrollen für die Amplifikation dienten die cDNAs, die *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte enthielten. Zum Vergleich wurde das *GAPDH*-Gen amplifiziert. **M**: 50 bp Marker und λ -ClaI-Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp**: Basenpaare.

Die cDNA aus dem peripheren Blut von 20 AML-Patienten, die alle eine akute myeloische Leukämie aufwiesen, wurde ebenfalls auf *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte untersucht. Für die Illustrierung der angewandten cDNA-Menge wurde ein Drittel der cDNA in der *GAPDH*-PCR eingesetzt. Von den 20 AML-Patienten wiesen 6 Patienten eine *NANOG1*-Bande und 18 Patienten eine *NANOG2*-Bande auf.

Weiterhin wurden unterschiedliche humane Gewebe untersucht. In keinem der adulten Gewebe, außer den hämatopoetischen Stammzellen (CD34+-Zellen) konnten Transkripte

von *NANOG1* oder *NANOG2* detektiert werden. Die hämatopoetischen Zellen (CD34+) wiesen hingegen die 314 bp große *NANOG2*-Bande auf.

Sowohl die Tumorzelllinien mit *MLL*-Translokationen als auch die Blutzellen der ALL- und AML-Patienten transkribieren demnach das *NANOG2*-Gen, während gesunde Probanden keine Transkripte vom Gen aufwiesen. Interessanterweise wurden *NANOG2*-Transkripte auch in hämatopoetischen Stammzellen detektiert, in denen bislang weder ein *NANOG2*- noch ein *NANOG1*-Transkript nachweisbar war.

3.2.7 Analyse der regulatorischen Bereiche vor *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen mittels des ChIP-Experiments

Die Transkription der Gene *NANOG1* und *NANOG2* scheint von zwei unterschiedlichen Promotoren reguliert zu sein, da *NANOG1/2*-Transkripte ihren Transkriptionsstartpunkt im Exon 3 und auch im Exon 1 besaßen. Genombereiche um die neuen Exons wurden jedoch bislang nicht auf ihre regulatorische Eigenschaften überprüft und wurden aus diesem Grund in dieser Arbeit genauer untersucht.

Durch den Vergleich der genomischen Sequenz stromaufwärts von *NANOG1* und *NANOG2* sind einige gDNA-Bereiche als stark homolog in Augenschein getreten. Die Domänen direkt vor Exon 3 (*alias* Exon 1) von *NANOG1* und *NANOG2* weisen 90% Homologie zueinander auf. Dieser Bereich wurde zuvor bereits als der Promotorbereich definiert, da viele der *NANOG1*-regulierenden Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich binden (Rodda *et al.*, 2005).

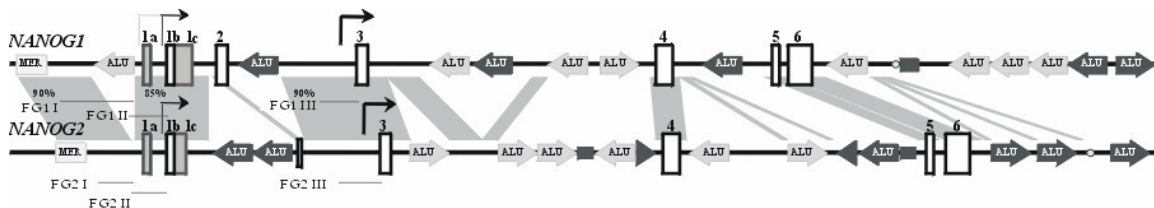


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Homologien zwischen der *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen und der ausgesuchten Fragmente FG I-III.

Die homologen Sequenzen zwischen den *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen sind durch graue Bereiche mit prozentualer Angabe der Homologie dargestellt. Die homologen Bereiche in den Regionen, wo die Transkriptionsstartpunkte (Pfeile über den Exons) vermutet werden, betragen 85 und 90 %. Die für ChIP-Analysen ausgesuchten Fragmente von *NANOG1* (FG1 I-III) und von *NANOG2* (FG2 I-III) liegen in den stark homologen Bereichen. **FG**: Fragment

Aufwärts von Exon 3 befinden sich zwei weitere zu 85 und 90% identische Genomabschnitte. Der erste Bereich liegt direkt in der Region, in der die neuen Exons 1a-c vorzufinden sind. Die zweite homologe Stelle befindet sich wenige bp weiter aufwärts und ist im Falle von *NANOG1* durch ein Alu-Element weiter nach vorne verschoben.

Diese Bereiche wurden als putative Promotor- bzw. regulatorische Bereiche vermutet.

Mit Hilfe vom ChIP-Experiment sollten folglich die drei Bereiche auf Interaktionen mit der RNA-Polymerase II, mit den beiden Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und auf gewisse Histonmodifikationen untersucht werden. Die Histonmodifikation H3K4-tri-Methylierung (aktiver Genombereich) und die Histonmodifikation H3K9-tri-Methylierung (reprimierter Genombereich) schienen dafür geeignet zu sein.

Im Experiment sollte ausschließlich die mit den vorher erwähnten Proteinen interagierende DNA vom Antikörper dieser Proteine gebunden werden und folglich an den A/G-beads haften bleiben. Es wurden außerdem zwei negative Kontrollen mitgeführt. Einerseits wurde der Antikörper weggelassen und die Bindung des Chromatins nur an die A/G-beads analysiert, andererseits wurde der IgG-Antikörper zu dem Chromatin zugegeben. Der IgG-Antikörper sollte keine Interaktion mit dem Chromatin aufweisen, da das IgG ein cytosolisches Protein ist und im Kern von einem Antikörper nicht erkannt werden sollte.

Für die Analyse wurden die embryonale Karzinomazelllinie NTERA-2 und die beiden t(4;11)-Zelllinien SEM und RS4;11 verwendet. Die drei zu untersuchenden homologen Bereiche vor Exon 3 wurden mit den römischen Nummern I-III gekennzeichnet (siehe Abb.3.13), wobei die am weitesten von Exon 3 entfernte Sequenz als I definiert wurde. Alle Fragmente (FG) von *NANOG1* wurden mit der arabischen Zahl 1 und die von *NANOG2* entsprechend mit 2 abgekürzt.

Die mit Hilfe der Antikörper gereinigten Chromatinfragmente wurden in PCR-Experimenten mit den Fragment I-III-abgreifenden Oligonukleotiden analysiert. Zur Demonstration der erfolgreichen PCR-Amplifikation wurde die gDNA eingesetzt, die vor der Behandlung mit den Antikörpern gewonnen und eingefroren wurde.

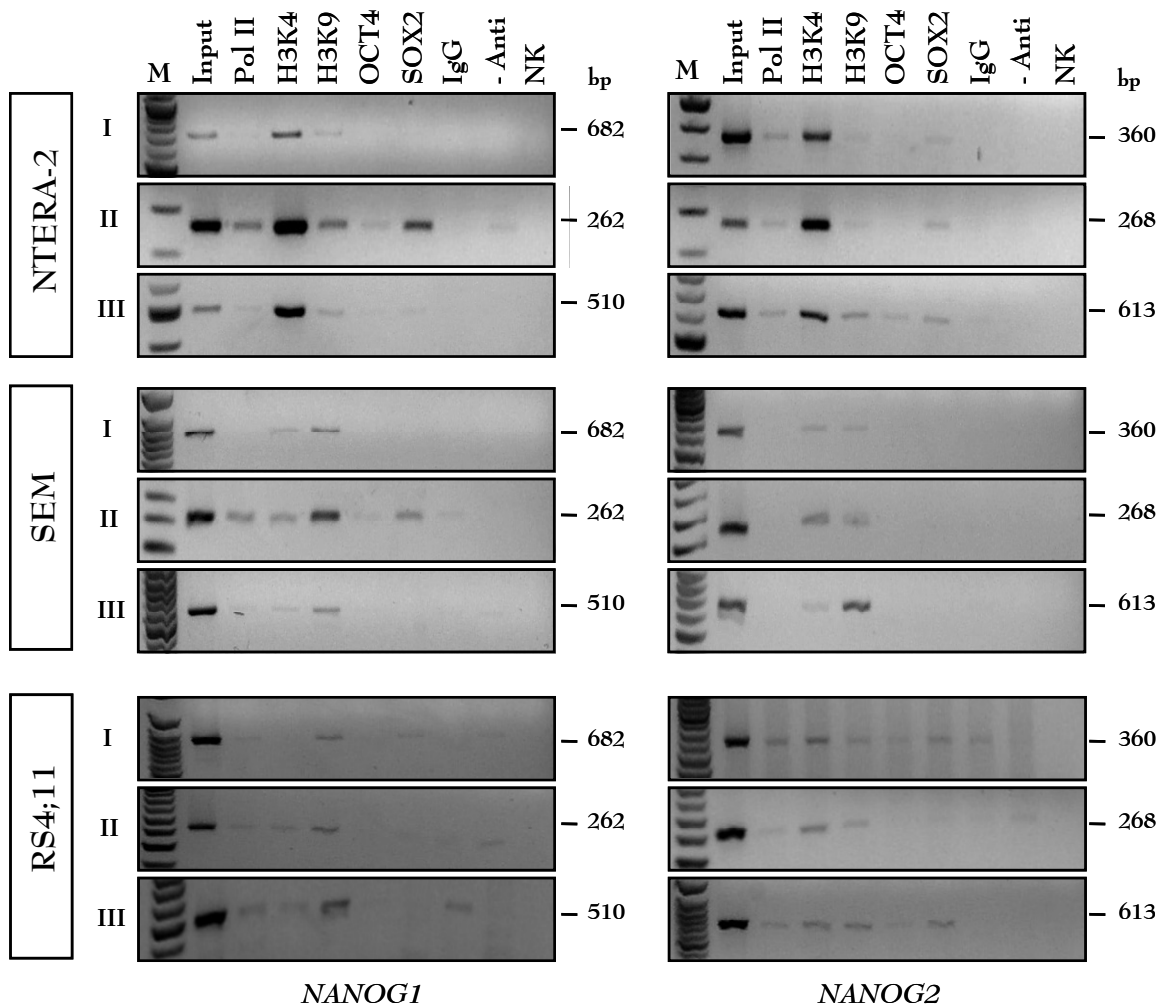


Abb. 3.14: Analyse der regulatorischen Regionen mit Hilfe des ChIP-Experiments.

Die ChIP-Analysen wurden mit den Antikörpern gegen die RNA-Polymerase II, die OCT4, SOX2-Transkriptionsfaktoren, gegen die Histonmodifikationen H3K4-tri-Methylierung und H3K9-tri-Methylierung und das cytosolische Protein IgG durchgeführt. Die untersuchten Fragmente sind als römische Zahlen I-III dargestellt. Untersucht wurden diese Fragmente in der embryonalen Zelllinie NTERA-2 und den beiden t(4;11)-Zelllinien SEM und RS4;11. **M**: 50/100 bp Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp**: Basenpaare, **-Anti**: ohne Antikörper, **Pol II**: RNA Polymerase II, **H3K4/H3K9**: H3K4/H3K9-tri-Methylierung, **Input**: unbehandelte gDNA.

Im Falle von NTERA-2, die sowohl *NANOG1* als auch *NANOG2* transkribiert, konnte mit dieser Methode eine Interaktion der RNA-Polymerase II sowohl mit dem bereits bekannten Interaktionsbereich vor Exon 3 als auch mit den Bereichen vor den neuen Exons von *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen detektiert werden. Das gleiche Interaktionsmuster ließ sich auch in RS4;11-Zellen erkennen, während in SEM-Zellen ausschließlich der zweite und der dritte Bereich nur von *NANOG1* eine Interaktion mit der RNA-Polymerase II zeigte.

Zwar konnte die Bindung von OCT4 und SOX2 zu allen drei Bereichen nachgewiesen werden, diese war jedoch nicht in jeder Zelllinie überall gleich vorhanden. Während bei den NTERA2-Zellen OCT4 und SOX2 wie erwartet an das III. Fragment (FG III) von *NANOG1* aber auch von *NANOG2* gebunden waren, war diese Interaktion in RS4;11-Zellen nur mit *NANOG2* zu erkennen. Es konnte auch eine Bindung dieser Proteine an das II. Fragment (FG II) von *NANOG1* in NTERA2- und SEM-Zellen nachgewiesen werden. Da die IgG-Kontrolle jedoch ebenfalls eine Bande im Agarosegel auf der gleichen Höhe aufwies, kann es sich unter anderem um ein Artefakt handeln.

Das SOX2 Protein band auch ohne OCT4 an das I. und II. Fragment von *NANOG2* in NTERA-2-Zellen. In anderen Zelllinien waren schwache Bindungen von SOX2 in anderen Bereichen zu erkennen, aber auch hier könnten es Artefakte sein, da die negativen Kontrollen ebenfalls Banden auf gleicher Höhe im Agarosegel aufwiesen.

Der Vergleich der Histonmodifikationen an den sechs untersuchten Bereichen zeigte ebenfalls gewisse Unterschiede zwischen den beiden Genen in der embryonalen Karzinomazelllinie und den t(4;11)-Zelllinien auf. In den NTERA-2-Zellen trugen alle Bereiche vor den beiden Genen mehr H3K4-als H3K9-tri-Methylierungen, während in den t(4;11)-Zellen alle Bereiche vor *NANOG1* und der dritte Bereich von *NANOG2* hingegen mehr H3K9- als H3K4-tri-Methylierungen aufwiesen und nur bei *NANOG2* die Bereiche I und II weiterhin mehr H3K4-Methylierungen trugen. Alle drei untersuchten Bereiche sowohl von *NANOG1* als auch von *NANOG2* waren in NTERA-2-Zellen demnach aktiviert, während in t(4;11)-Zellen nur die ersten beiden Fragmente ausschließlich von *NANOG2* keine Reprimierung zeigten. Die exklusive Transkription des *NANOG1*-Gens in NTERA-2-Zellen war demnach auf epigenetische Regulation zurückzuführen.

3.2.8 Analyse der regulatorischen Region in embryonalen und nicht-embryonalen Zelllinien mit Hilfe des Reportergenexperiments

Auf der Basis der bisherigen Ergebnisse wurde vermutet, dass die drei homologen Bereiche vor den *NANOG1*- (FG1 I-III) und *NANOG2*-Genen (FG2 I-III) möglicherweise Promotoren darstellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die homologen Regionen aus dem Genom von NTERA-2-Zellen amplifiziert und vor ein Luziferase-kodierendes Gen in den Vektor pGL3basic kloniert.



Abb. 3.15: Schematische Darstellung der für die Reportergen-Analyse verwendeten Vektoren.

Die in Abbildung 3.13 dargestellten Fragmente I-III von *NANOG1* und *NANOG2* wurden vor das Luziferase-kodierende Gen in den Vektor pGL3basic kloniert. **NK**: promotorloser pGL3basic-Vektor, **FG**: Fragment.

Die Firefly-Luziferaseaktivität wurde nach der Transfektion der Vektoren in die embryonale Karzinomzelllinie NTERA-2 und die nicht-embryonale Zelllinie HeLa mit Hilfe des Luziferase Kits gemessen. Als negative Kontrolle (NK) diente der promotorlose Vektor pGL3basic, der ebenfalls transfiziert und die Luziferaseaktivität analog nach 24 h bei NTERA-2-Zellen und 48 h bei HeLa-Zellen bewertet wurde. Die interne Kontrolle und folglich der Bezugswert war die Aktivität einer zweiten Luziferase (Renilla), die nach einer Kotransfektion konstitutiv in allen Zellen exprimiert wurde.

Wie in Abbildung 3.16 gezeigt ist, wurde der Bereich III vor *NANOG1* und vor *NANOG2* sowohl in embryonalen als auch nicht-embryonalen Zellen als Promotor benutzt, wodurch eine erhöhte Luziferaseaktivität gemessen werden konnte. In embryonalen Zellen wurde außerdem der Bereich II vor *NANOG1* (FG1 II) als aktiver Promotorbereich von der RNA-Polymerase II benutzt, da eine stärkere Luziferaseaktivität als beim III. Bereich von *NANOG1* (FG1 III) detektiert wurde.

Die anderen Bereiche zeigten nur eine geringe Aktivität, die auch bei der negativen Kontrolle zu beobachten war. Für den I. Bereich vor *NANOG2* (FG2 I) konnte in NTERA-2-Zellen zwar eine etwas höhere Aktivität gemessen werden, diese war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur der negativen Kontrolle.

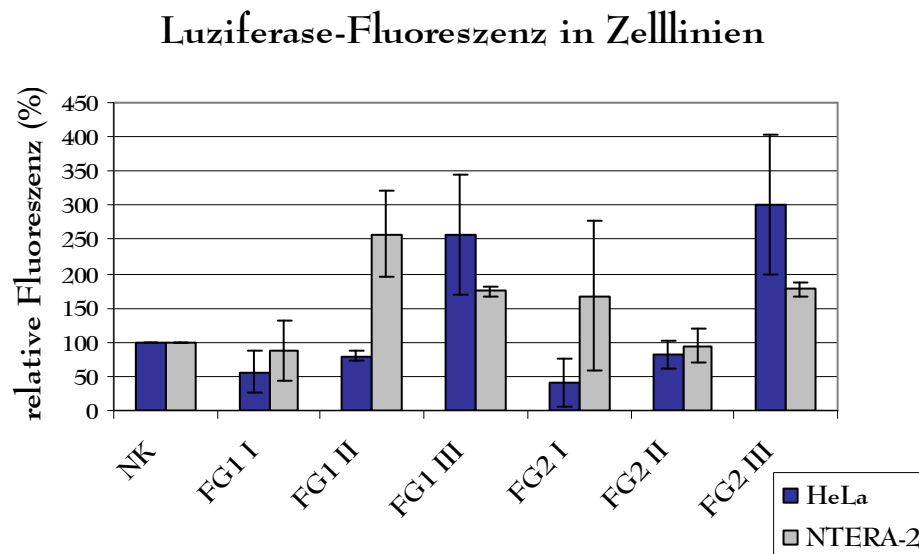


Abb. 3.16: Luziferase-Reportergen-Analysen in der embryonalen Zelllinie NTERA-2 und der nicht-embryonalen Zelllinie HeLa.

Die Fragmente FG1/2 I-III aus den *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen wurden vor ein Luziferase-kodierendes Gen kloniert und in die Zelllinien HeLa und NTERA-2 transfiziert. Die relative Fluoreszenz der Konstrukte wurde auf die relative Fluoreszenz des promotorlosen pGL3basic (NK) bezogen. Alle Versuche wurden 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt. **FG:** Fragment

Allen bisherigen Ergebnissen zufolge, wird die Transkription der *NANOG1*- und *NANOG2*-Gene von mehreren Promotoren in den unterschiedlichen Zellen auf verschiedene Weise reguliert, wodurch eine Vielzahl von *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkriptvarianten entstehen.

3.3 Charakterisierung der NANOG-Proteine mittels immunologischer Experimente

3.3.1 Analyse der NANOG-Expression in NTERA-2- und SEM-Zellen

Zur Studie der *NANOG*-Regulation wurden parallel zu Transkriptionsanalysen Expressionsanalysen in der t(4;11)-Zelllinie SEM und der Kontrollzelllinie NTERA-2 durchgeführt. Für die Detektion wurde in Western Blot-Experimenten ein C-terminaler Antikörper benutzt, da auch kurze Proteinvarianten von NANOG, die durch Pseudo-/Retrogene kodiert werden könnten, ebenfalls sichtbar gemacht werden sollten.

Nach dem Zellaufschluss der Zellen wurde die lösliche Fraktion getrennt von der pelletierten Fraktion in SDS-PAGE aufgetragen. Sowohl im Überstand von NTERA-2- als auch von SEM-Lysaten konnten Banden bei etwa 48 und bei 32 kDa detektiert werden. Im NTERA-2-Überstand waren zusätzlich Banden bei etwa 46 kDa, bei etwa 35 kDa und zwei weitere Banden unterhalb der 32 kDa-Markierung nachzuweisen. Nur die 35 kDa-Bande entsprach der erwarteten Größe von NANOG1. Sobald der gleiche NTERA-2-Überstand mit dem N-terminalen Antikörper hybridisierte, detektierte dieser im Gegensatz zu dem C-terminalen Antikörper nur eine Bande, die unterhalb der 47 kDa-Markierung lief und somit ein höheres Laufverhalten im SDS-PAGE zeigte.

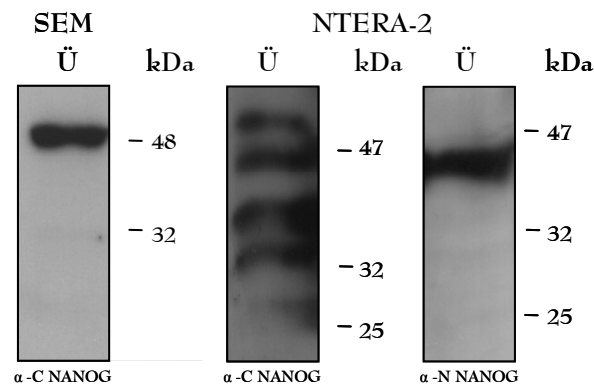


Abb. 3.17: Nachweis der NANOG1-Expression in der nicht-embryonalen t(4;11)-Zelllinie SEM und der embryonalen Zelllinie NTERA-2 mit NANOG-Antikörpern.

Mit Hilfe des C-terminalen (α -C NANOG) und des N-terminalen (α -N NANOG) NANOG-Antikörpers wurden in Überständen der Zelllysate NTERA-2 und SEM NANOG-Proteine detektiert. Das berechnete NANOG1-Molekulargewicht beträgt 35 kDa. Ü: Überstand, kDa: Kilodalton. Verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

3.3.2 Analyse des möglichen Abbaus der NANOG1-Proteine

Die Vielzahl der detektierten Proteinbanden war zunächst nicht erklärbar. Um Proteinabbau auszuschließen, wurde das Experiment mit dem Proteasominhibitor MG132 wiederholt. Außerdem wurde dem Lysepuffer stets ein Protease- und Phosphataseinhibitormix zugegeben.

Sowohl die NTERA-2- als auch die SEM-Zelllysate zeigten bei diesen Bedingungen die gleichen Bandenmuster, mit Proteinbanden zwischen 58 und 21 kDa (siehe Abb. 3.18). Daraus wurde geschlossen, dass die detektierten Proteinbanden von NANOG1 nicht auf

Proteinabbau zurückzuführen sind. Interessanterweise konnten in den NTERA-2-Lysaten mehrere Banden nachgewiesen werden, die in vorherigen Experimenten nicht gezeigt wurden. Für dieses Experiment wurde ein anderer, sensitiverer C-terminaler NANOG-Antikörper benutzt. Nichtsdestotrotz waren die vorher beschriebenen Banden auch diesmal sowohl in NTERA-2- als auch in SEM-Zelllysaten aufgetreten. Die 48 kDa-Bande und die 32 kDa-Bande waren erneut gut zu erkennen, wobei es sich beim letzteren um eine Doppelbande handelte.

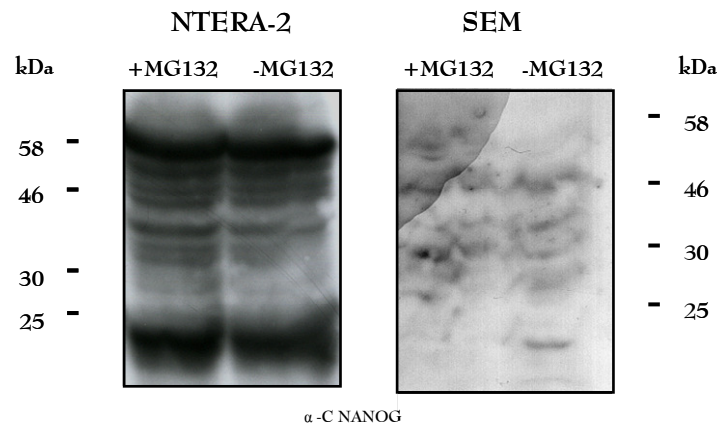


Abb. 3.18: Überprüfung des proteasomalen Abbaus der NANOG1-Proteine in NTERA-2- und SEM-Zellen.

Dargestellt sind Lysate der Zelllinien NTERA-2 und SEM, denen 16 h vorher der Proteasominhibitor MG132 zugegeben wurden (+). Zum Vergleich für den Proteinabbau wurde eine Lysatprobe von Zellen aufgetragen, denen kein MG132 zugegeben wurde (-). Die Proteine wurden mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper (α -C NANOG) detektiert. **kDa**: Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Sowohl in NTERA-2- als auch in SEM-Lysaten wurden außerdem Banden bei etwa 58 kDa, 35 kDa, unterhalb der 30 kDa- und der 25 kDa-Markierung nachgewiesen. Die beiden Proteinbanden bei etwa 54 kDa und 46 kDa ließen sich jedoch nur in den NTERA-2-Lysaten detektieren.

Erstaunlicherweise lief eine Vielzahl der detektierten NANOG-Proteinbanden im SDS-PAGE sowohl oberhalb als auch unterhalb der erwarteten Größe von 35 kDa und einige wenige Proteinvarianten waren nur im NTERA-2-Zelllysate zu finden.

3.3.3 Theoretische Bestimmung der unterschiedlichen NANOG1- und NANOG2-Proteine

Die Frage, inwieweit die in dieser Arbeit untersuchten unterschiedlichen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte eine gute Vorlage für den Translationsprozess liefern und damit die unterschiedlichen Proteingrößen in SDS-PAGE erklären würden, sollte in Immunologischen Experimenten untersucht werden.

Das *NANOG1*-Gen hat 6 und das *NANOG2*-Gen 5 Start-Codons, die für die Proteinsynthese genutzt werden können, ohne den Leserahmen zu verschieben. Die für den Leserahmen kodierende Region wurde in der Abbildung 3.19 schwarz untermalt. Da jede *NANOG1*-Transkriptvariante aufgrund der im Exon 6 zuweilen fehlenden 48 bp in zwei unterschiedlichen Variationen vorliegen kann, kann jede *NANOG1*-Transkriptvariante für zwei verschiedene Proteine kodieren, die sich in ihrer CD1-Domäne unterscheiden. Folglich wurden bei *NANOG1*-Transkripten immer zwei Proteine dargestellt. Die apostrophierten *NANOG1* A- und B-Proteinvarianten entstehen aus den die Deletion tragende Transkripte, wodurch 16 AS in der CD1-Domäne der Proteine fehlen.

In einigen Fällen kodieren unterschiedliche Transkriptvarianten für die gleiche Proteinvariante, da bei der Translation das gleiche ATG verwendet wird. Aus diesem Grund wurden diese Transkriptvarianten unter dem gleichen Proteinnamen zusammengefasst. Dazu zählt die Vielzahl an unterschiedlichen *NANOG1*-oder *NANOG2*-Transkriptvarianten, die für das Protein B bzw. D kodieren.

Die entstehenden Proteingrößen variieren zwischen 35 kDa und 32 kDa bei *NANOG1* und zwischen 29 kDa und 19 kDa bei *NANOG2*, wobei der N-Terminus der Proteine N-terminal reduziert wird. Nur im Transkript *NANOG2 E*, in welchem das Exon 1 zu Exon 4 spleißt, könnte das ATG im Exon 1 für die Synthese genutzt werden, wodurch ein größeres chimäres Protein von 32 kDa entstehen könnte. Bei dieser Transkriptvariante könnte als Alternative auch das im Exon 4 liegende *bona fide* ATG für die Proteinsynthese benutzt werden, wodurch zwar ein kleineres Protein von 27 kDa entstehen, aber der offene Leserahmen ausschließlich vom *NANOG*-Protein stammen würde.

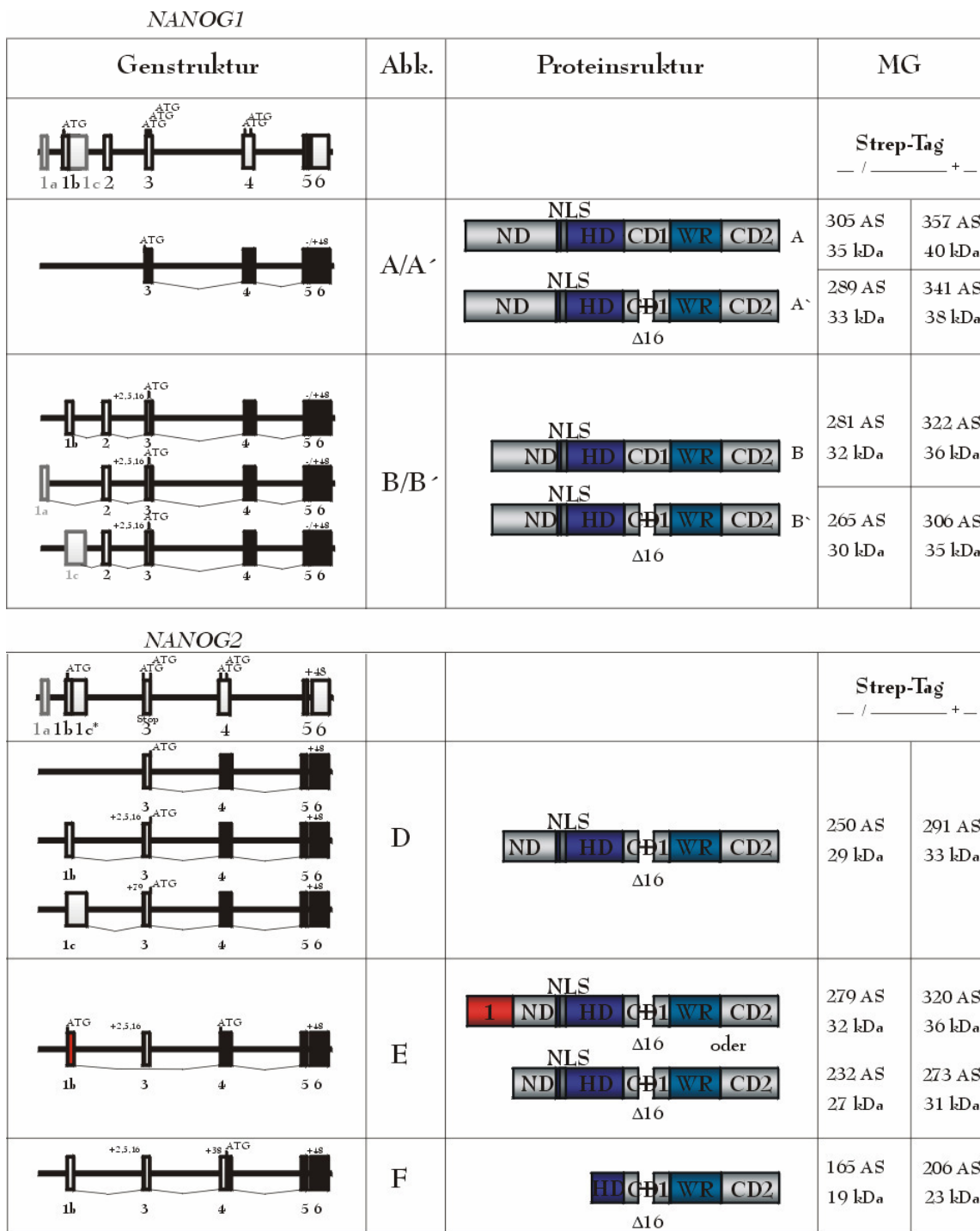


Abb. 3.19: Darstellung der gefundenen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte und ihre theoretische Translationsprodukte.

Dargestellt sind alle bisher gefundenen Transkripte von *NANOG1* und *NANOG2* und die dazugehörigen Translationsprodukte. Die im Transkript vorliegenden Exons sind durch Linien verbunden, wobei die für die Translation genutzten Exons schwarz unterteilt und die dafür verwendeten Startcodons oberhalb der Exons markiert sind. Weiterhin stellen die oberhalb der Exons angeführten Zahlen die Basenpaare dar, die durch das Spleißen aus der Sequenz entfernt

werden. Alle Transkripte, die für das gleiche Protein kodieren, sind unter dem gleichen Proteinnamen (A-F) zusammengefasst. Apostrophierte Namen stehen für Proteine, denen 16 AS in der CD1-Domäne fehlen. Die bei der Translation entstehenden Proteine sind mit ihren verbliebenen Domänen, Aminosäuren und den Proteingrößen dargestellt. Da im Verlauf der Arbeit die synthetisierten Proteine einen Strep-Tag (+) tragen, sind aus diesem Grund die Aminosäuren und die Massen der Strep-Tag-Proteine ebenfalls aufgeführt. Im Fall von *NANOG2 E* kann entweder das im Exon 1 oder im Exon 4 liegende ATG benutzt werden. Aus diesem Grund sind bei dieser Transkriptvariante zwei Proteinvarianten möglich. Der nicht zum offenen Leserahmen von *NANOG2* gehörende N-terminale Abschnitt ist im ersten *NANOG2 E*-Protein folglich rot hervorgehoben. **MG**: Molekulargewicht, **Abk.**: Abkürzung für den Proteinnamen, **ND**: N-terminale Domäne, **CD**: C-terminale Domäne, **NLS**: Nukleuslokalisierungssignal, **HD**: Homeodomäne, **WR**: Tryptophan-Wiederholungsdomäne, **AS**: Aminosäuren, **kDa**: Kilodalton.

Alle Proteinvarianten außer der *NANOG2 F*-Variante würden trotz des fehlenden N-terminalen Abschnittes ihre wichtigsten Funktionsdomänen behalten.

Da im Folgenden mit Proteinen gearbeitet wird, die einen Strep-Tag am C-Terminus tragen, wurden in der Abbildung 3.19 auch die jeweiligen Proteingrößen inklusive des Strep-Tags aufgezeigt.

3.3.4 Proteinexpression in HEK-293T-Zellen

Für die Expression der verschiedenen Proteinvarianten wurden die Spleißtranskripte *NANO1 A*, *NANO1 B*, *NANO2 D* und *NANO2 E* vor einen Strep-Tag und hinter einen CMV-Promotor in den Vektor pEXPR-IBA10-3::*HpaI*, *SfiI* kloniert.



Abb. 3.20: Schematische Darstellung des für die Proteinexpression verwendeten Vektors.

Gezeigt ist exemplarisch das *NANO1 A* enthaltende Plasmid pEXPR-IBA10-3::*NANO1 A*. Anstelle von der *NANO1 A*-Sequenz wurden auch die Sequenzen *NANO1 B*, *NANO2 D* und *NANO2 E* in den Vektor pEXPR-IBA10-3::*HpaI*, *SfiI* kloniert. Der kodierende Bereich ist durch die Start- und Stop-Markierungen dargestellt.

Die Vektoren wurden in die Zelllinie HEK-293T transfiziert und nach 48 h konnten die exprimierten Proteine mittels Strep-Tag aufgereinigt werden.

3.3.5 Western Blot-Analyse der in HEK-293T produzierten Proteine

In jeder Proteinaufreinigung wurden die Strep-markierten Proteine in zwei Schritten von der Säule eluiert. Proteine aus beiden Elutionsschritten wurden in SDS-Gelen aufgetrennt und sowohl mit dem Antikörper gegen Strep-Tag als auch gegen den C-Terminus von NANOG im Western Blot analysiert (siehe Abb. 3.21).

Alle klonierten Spleißvarianten wurden in Proteine translatiert und waren sowohl mit dem Strep- als auch mit dem NANOG-Antikörper nachweisbar.

Erstaunlicherweise liefen einige dieser Proteine nicht auf der erwarteten Höhe. Die NANOG1 B-Proteinvariante lief zwar auf der richtigen Höhe, wies aber auch eine zweite etwas schwächere drüber laufende Bande auf. Die NANOG1 A-Variante lief bei etwa 50 kDa und zeigte somit ein 10 kDa höheres Laufverhalten im SDS-PAGE.

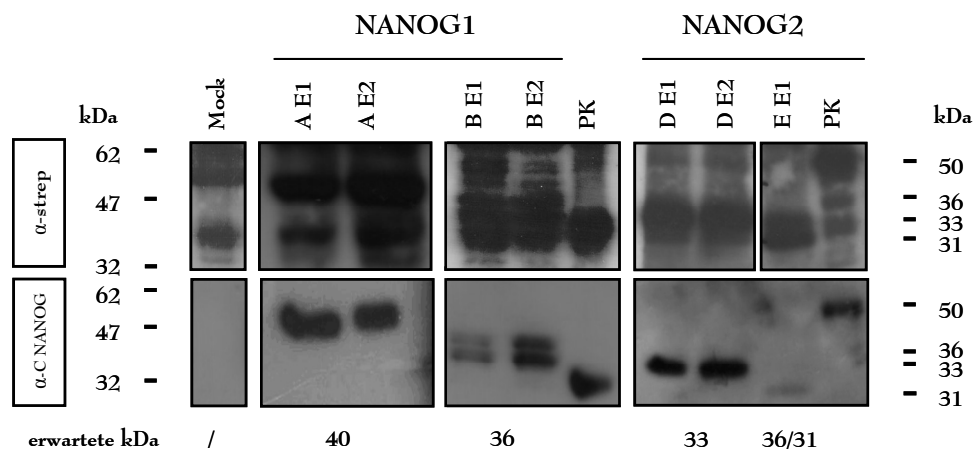


Abb. 3.21: Nachweis von NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten mit einem C-terminalen NANOG- und einem Strep-Antikörper.

Die beiden Elutionsproben der NANOG1 und NANOG2-Proteinaufreinigung wurde mit dem Strep- und dem C-terminalen NANOG-Antikörper detektiert. Als negative Kontrolle für die Proteinsynthese wurden die HEK-293T-Zellen benutzt, in die der leere Vektor transfiziert war (Mock). Die erwarteten Proteingrößen sind unter den Blotbildern und die detektierten Proteingrößen rechts von den Blotbildern dargestellt. **PK**: Positive Kontrolle für den Western Blot, **E**: Elutionsprobe, **kDa**: Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Die NANOG2-Proteinvarianten zeigten ebenfalls Unregelmäßigkeiten auf. Die Proteinvariante NANOG2 E lief bei 31 kDa und startete somit vom zweiten im offenen Leserahmen liegende *bona fide* ATG. Die Proteinvariante NANOG2 D lief wie erwartet bei etwa 33 kDa.

Mit dem sensitiveren gegen den C-Terminus gerichteten NANOG-Antikörper konnten analog zu dem bereits beschriebenen Experiment weitere Proteinbanden detektiert werden, deren Größen nicht den erwarteten entsprachen (siehe Abbildung 3.22).

Das NANOG1-A-Eluat wies mehrere Proteinbanden zwischen 50 und etwa 33 kDa auf. Die höchste Bande lief im SDS-PAGE bei 50 kDa. Eine weitere Bande verlief bei etwa 46 kDa und somit höher als die berechnete Größe von 40 kDa. In dieser Größenordnung konnte ebenfalls eine Bande detektiert werden. Außerdem waren Proteinbanden bei etwa 36 und 33 kDa zu erkennen.

Wie die Eluate von NANOG1 B wiesen alle NANOG2-Eluate neben einer Bande auf der richtigen Höhe ebenfalls eine um etwa 3 kDa im SDS-PAGE höher verlaufende Bande auf. Bei der Proteinvariante NANOG2 D konnte außerdem eine Verschiebung des Proteins um 2 kDa nach unten detektiert werden.

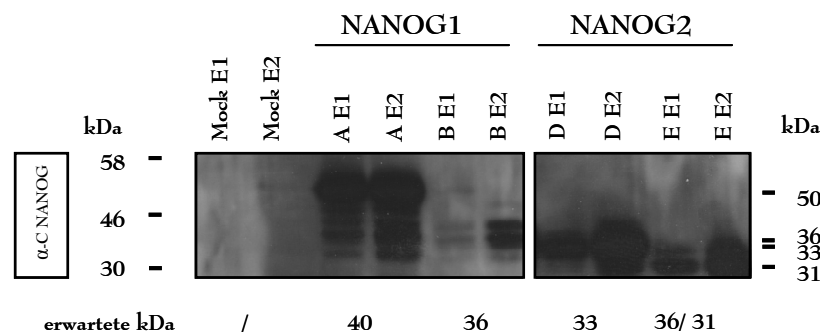


Abb. 3.22: Nachweis von NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten mit einem C-terminalen NANOG-Antikörper.

Die beiden Elutionsproben der Proteinvarianten NANOG1 A und B und der Proteine NANOG2 D und E wurde mit einem weiteren C-terminalen NANOG-Antikörper analysiert. Als negative Kontrolle für die Proteinsynthese wurden die HEK-293T-Zellen benutzt, in die der leere Vektor transfiziert wurde (Mock). Die erwarteten Proteingrößen sind unter den Blotbildern und die detektierten Proteingrößen rechts von den Blotbildern dargestellt. **E:** Elutionsprobe, **kDa:** Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker

Eine weitere Überprüfung der Proteinexpression erfolgte mit dem N-terminalen NANOG-Antikörper, der speziell nur an NANOG1-Proteine bindet, da allen NANOG2-Proteinvarianten der Hybridisierungsabschnitt fehlt (siehe Abb. 3.23). Zum Vergleich wurden die Proteine mit einem C-terminalen Antikörper analysiert.

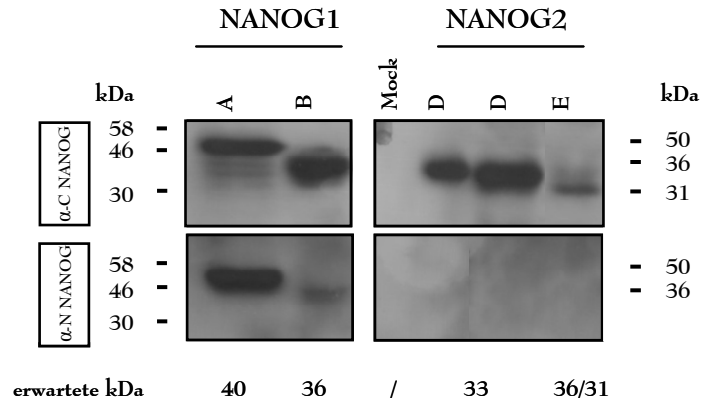


Abb. 3.23: Nachweis von NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten mit einem C-terminalen und N-terminalen NANOG-Antikörper.

Eine Elutionsprobe der Proteinvarianten NANOG1 A und B und der Proteine NANOG2 D und E wurde mit einem C-terminalen und N-terminalen NANOG-Antikörper detektiert. Als negative Kontrolle für die Proteinsynthese wurden die HEK-293T-Zellen benutzt, in die der leere Vektor transfiziert wurde (Mock). Die erwarteten Proteingrößen sind unter den Blotbildern und die detektierten Proteingrößen rechts von den Blotbildern dargestellt. **E:** Elutionsprobe, **kDa:** Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Wie erwartet, waren nur NANOG1-Proteinvarianten durch den N-terminalen Antikörper detektierbar. Die NANOG1-Proteine könnten demnach von NANOG2-Proteinen sehr einfach mit Hilfe des N-terminalen Antikörpers unterschieden werden.

3.3.6 Proteinanalyse mit Hilfe von MALDI-MS/MS

Zur Identifizierung bzw. Verifizierung der bei 50 kDa verlaufenden Proteinbande in NANOG1 A-Eluaten wurden die in Abbildung 3.24 gezeigten Banden aus dem Gel isoliert, nach einem Trypsinverdau zunächst einer MALDI-MS- und anschließend einer MALDI-MS/MS-Analyse unterzogen. Die bei etwa 50 kDa verlaufende Bande konnte mit einer Sequenzabdeckung von 30 % als NANOG1 identifiziert werden (siehe Anhang).

In weiteren MALDI-Untersuchungen konnten außerdem die beiden bei 33 und 36 kDa verlaufenden Banden der NANOG2 D-Eluate ebenfalls als NANOG-Proteine identifiziert werden.

Alle exogen in HEK-293T synthetisierten Proteinvarianten wiesen demnach im SDS-PAGE neben den erwarteten Proteinbanden auch Banden mit einem höheren Molekulargewicht auf. Besonders die NANOG1 A-Proteinvariante wies einen

Größenunterschied von etwa 10 kDa auf und sollte folglich auf mehrere Modifikationen hin überprüft werden.

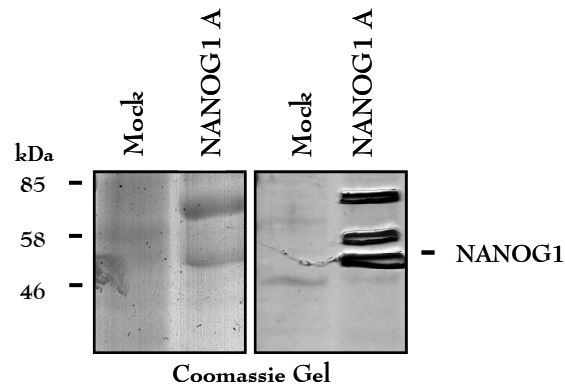


Abb. 3.24: Darstellung der mit Coomassie gefärbten Proteinbanden für die MALDI-Analyse.

Gezeigt sind die mit Coomassie angefärbten Banden der Elutionsprobe NANOG1 A, die für die MALDI-Analyse ausgeschnitten wurden. Als negative Kontrolle dienten die HEK-293T-Zellen, in die der leere Vektor transfiziert wurde (Mock). **kDa:** Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

3.3.7 Charakterisierung der Proteinmodifikation

Einige der wichtigsten und am weitesten bekannten Modifikationen sind Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinierungen und Sumoylierungen. Folglich wurden mit Hilfe des Western Blots analysiert, ob NANOG-Proteine diese Modifikationen tragen. Die NANOG-Proteinaufreinigung erfolgte über die Streptavidin-Säulen aus den Lysaten der HEK-293T-Zellen, die 48 h vorher mit den Proteinkodierenden Sequenzen transfiziert wurden. Im Falle von Sumoylierung wurden die Proteine in einer Co-Immunopräzipitation mit dem anti-Sumo-Antikörper zunächst gereinigt und mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper analysiert. Alle NANOG2-Proteine konnten nach der Co-Immunopräzipitation im Western Blot detektiert werden. Bei NANOG1-Proteinvarianten ließ sich nur schwer ermitteln, ob sie ebenfalls vom SUMO-Antikörper gebunden wurden. Die Proteinvarianten NANOG1 A und B liefen nämlich auf der gleichen Höhe wie die Kreuzreaktionsbanden, die auch in der Mock-Kontrolle zu erkennen waren (siehe Abb. 3.25).

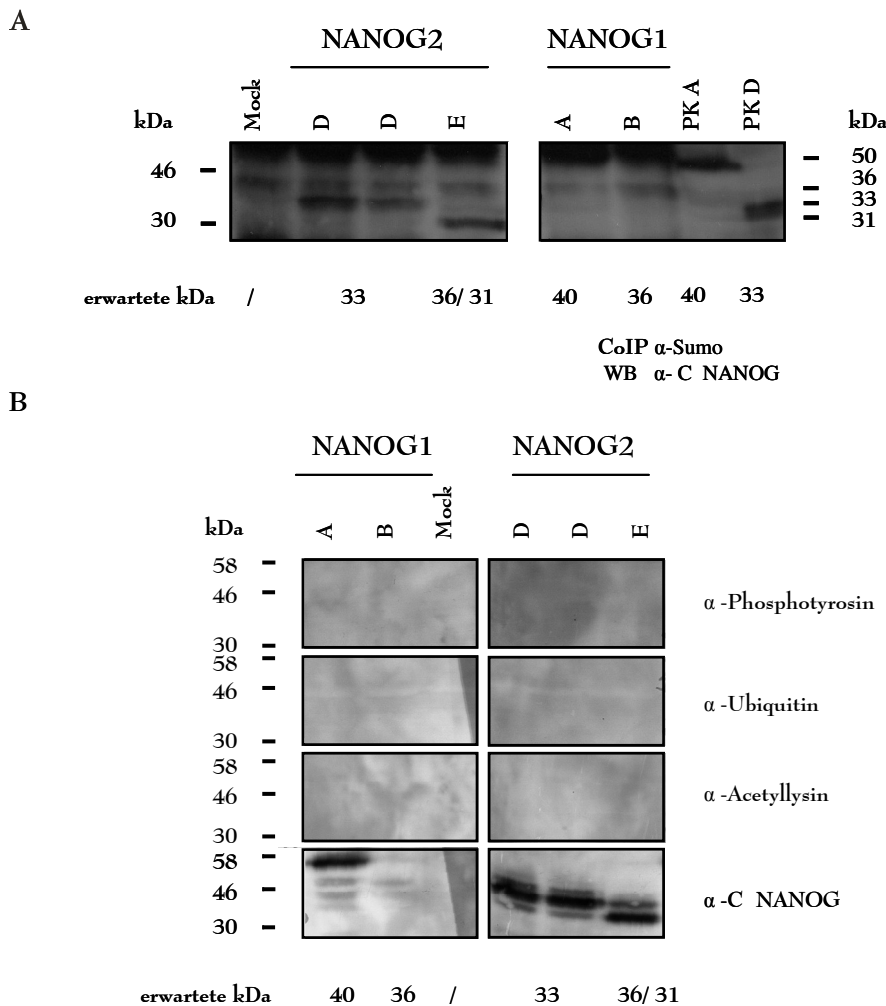


Abb. 3.25: Analyse der Proteinmodifikationen an NANOG1- und NANOG2-Proteinen.

(A): Die Proteine NANOG1 A, B, NANOG2 D und E wurden mit dem Sumo-Antikörper gereinigt und die eluierten Proben mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper analysiert. **PK**: positive Kontrolle für den Western Blot: gereinigte NANOG1 A- und NANOG2 D-Proteine. Als negative Kontrolle für die Co-Immunopräzipitation (CoIP) wurden die HEK-293T-Zellen benutzt, in die der leere Vektor transfiziert wurde (Mock). (B): Nachweis der Modifikationen an den Proteinvarianten NANOG1 A, B, NANOG2 D und E mittels der Phosphotyrosin-, Ubiquitin- und Acetyllysinantikörper. Als Kontrolle für die Western Blots wurden die Proteine mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper detektiert. Die erwarteten Proteingrößen sind unter den Blotbildern dargestellt. **kDa**: Kilodalton, **WB**: Western Blot, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Die Ubiquitin-, Phosphotyrosin- und Acetyllysin-Modifikationen wurden an keinem der Proteine detektiert, obwohl genügend Protein eingesetzt wurde, wie dies an dem untersten Blot mit NANOG-spezifischen Antikörpern zu erkennen ist.

Allen Ergebnissen zufolge können die in Tumorzellen gefundenen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripte in unterschiedlich große NANOG1- und NANOG2-Proteine

translatiert und diese zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen verändert werden, wodurch eine Vielzahl an NANOG-Proteinen in der Zelle vorliegen kann.

3.3.8 Massenvergleich zwischen gereinigten NANOG-Proteinvarianten und den in Zelllysaten detektierten NANOG-Proteinen

Aufgrund der in Western Blot-Experimenten gewonnenen Ergebnisse konnte erstmalig eine Zuordnung der unterschiedlichen NANOG-Proteine aus den untersuchten Zelllysaten zu den Proteinvarianten erfolgen. Die nur im NTERA-2-Lysat verlaufende Bande von 46 kDa entsprach der Größe von der modifizierten NANOG1 A-Variante ohne den Strep-Tag (siehe Abb. 3.26). Sowohl in der NTERA-2- als auch in der SEM-Probe ließ sich außerdem eine Bande bei etwa 33 kDa erkennen, deren Molekulargewicht der NANOG1 B-Proteingröße entsprach. Unterhalb der 33-kDa-Bande zeichnete sich in beiden Zelllysaten eine weitere Bande bei etwa 30 kDa ab, die der NANOG2 D-Proteinvariante, deren Molekulargewicht bei 29 kDa liegt, zuordenbar war. Die ohne den Strep-Tag 27 kDa betragende Proteinvariante NANOG2 E ließ sich der über der 25 kDa-Markierung verlaufenden Bande im NTERA-2-Zelllysate zuordnen.

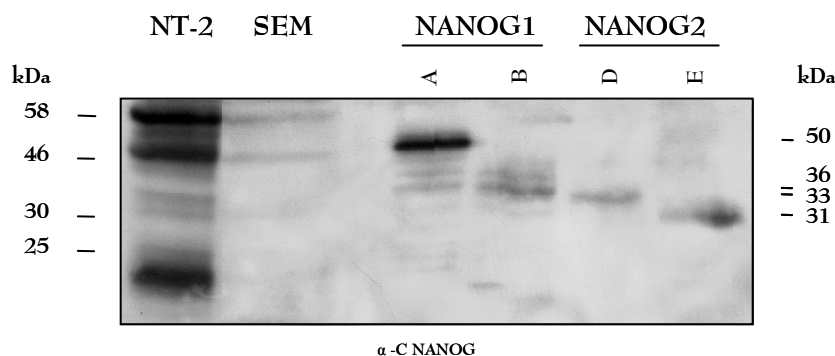


Abb. 3.26: Nachweis von NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten mit einem C-terminalen NANOG-Antikörper.

Die Lysatproben der Zellen NTERA-2 (NT-2) und SEM wurden zusammen mit Elutionsproben der Proteinvarianten NANOG1 A und B und der Proteine NANOG2 D und E aufgetragen und mit einem C-terminalen NANOG-Antikörper detektiert. Die detektierten Proteingrößen der gereinigten Proteine sind rechts von den Blotbildern dargestellt. **kDa**: Kilodalton, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Sowohl die embryonale Zelllinie NTERA-2 als auch die t(4;11)-Zelllinie SEM produzieren demnach eine Vielzahl an NANOG-Proteinen, die ein kleineres

Molekulargewicht als NANOG1 aufweisen, aber vermutlich NANOG2-Proteine darstellen, da alle NANOG2-Proteine sich den Proteinbanden in Zelllysaten zuweisen ließen.

3.3.9 Analyse des Zielkompartiments von verschiedenen NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten

Eine weitere wichtige Fragestellung bestand darin, die intrazelluläre Lokalisation der Proteine zu bestimmen. Dafür wurden die Protein-kodierenden Sequenzen und der leere pEXPR-IBA10-3::HpaI, SfiI-Vektor (Mock) in die HeLa-Zellen transfiziert und die Proteinproduktion mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper in immunohistologischen Experimenten analysiert. Der zweite gegen den NANOG-Antikörper gerichtete Antikörper war FITC-konjugiert und fluoreszierte unter Bestrahlung grün.

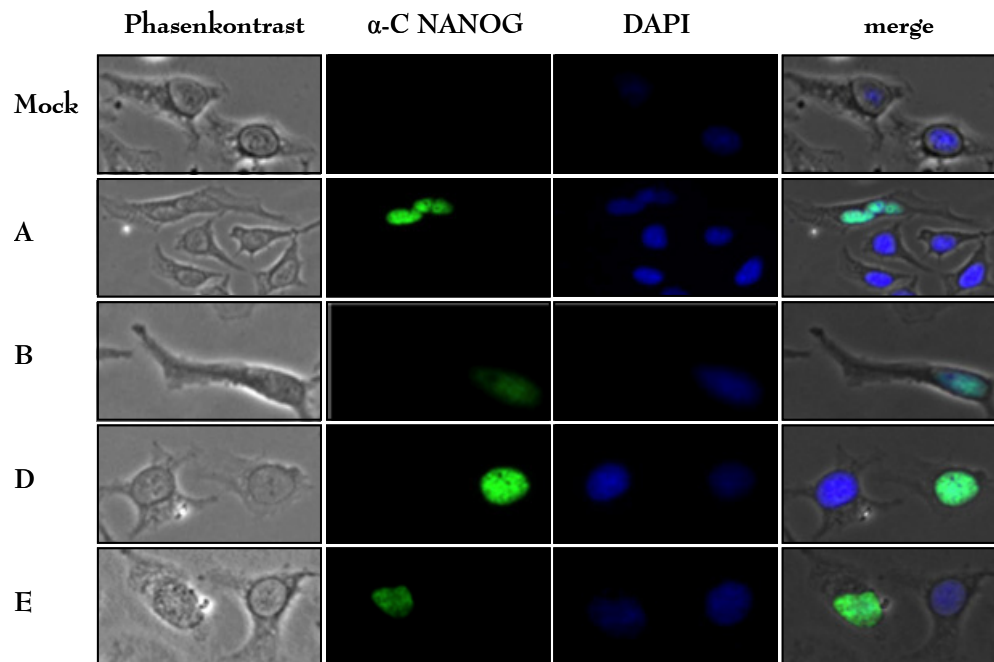


Abb. 3.27: Charakterisierung des Kompartiments, in denen NANOG1- und NANOG2-Proteine lokalisiert sind.

Die HeLa-Zellen wurden im Phasenkontrast, im blauen und im ultravioletten Wellenlängenbereich bestrahlt und die dabei resultierende Lichtemission von NANOG-Antikörpern (grün) und des Zellkern-markierenden Farbstoffs (DAPI; blau) aufgenommen. Die dabei resultierenden Bilder wurden zur besseren Darstellung übereinander gelagert (merge). Als negative Kontrolle wurden die mit einem leeren Vektor transfizierten Zellen verwendet. (Mock).

Um den Ort der Fluoreszenz besser zu erkennen, wurde DAPI zum Anfärben der Zellkerne benutzt, der bei Ultraviolettbestrahlung blaues Licht emittierte.

Zur Darstellung der Cytoplasmaregion wurde eine Phasenkontrastaufnahme erstellt und mit den anderen Bildern überlagert (merge). Das Cytoplasma ließ sich als graue punktierte Fläche um die blauen Kerne erkennen (siehe Abb. 3.27). Im Vergleich zu Mockzellen wiesen einige der Zellkerne von allen NANOG-Protein-produzierenden Zellen grüne Fluoreszenz ausschließlich in ihren Zellkernen auf. Alle synthetisierten NANOG1- und NANOG2-Varianten waren somit analog zum dem bekannten NANOG1 A-Protein nur in den Zellkernen lokalisiert.

3.4 Funktionelle Analysen

3.4.1 Ektopische NANOG1- und NANOG2-Expression in HEK-293wt-Zellen

3.4.1.1 Überprüfung der NANOG-Synthese in HEK-293wt-Zellen auf Genom- und Proteinebene

Inwieweit die unterschiedlichen NANOG-Proteinvarianten die gleiche oder ähnliche Funktion wie das tatsächliche bisher beschriebene NANOG1-Protein haben, sollte mit Hilfe der Genexpressionsanalyse überprüft werden. Diese wurden von zwei unterschiedlichen Gruppen durchgeführt. Vorher wurden die Varianten NANOG1 A, NANOG1 B, NANOG2 D und NANOG2 E in den auf Gentranskriptionsveränderung untersuchten HEK-293wt-Zelllinie überexprimiert. Um gewisse falsch positive Gentranskriptionsveränderungen durch den genomischen Einbau von neuen Sequenzen zu vermeiden, wurden die Transkripte von einem episomalen Vektor (pEPI-eGFP) abgelesen. Dieser Vektor hat eine S/MAR-Bindedomäne, wodurch es an Chromosomen haften bleibt. Durch einen internen Replikationsstartpunkt kann es in sich teilenden Zellen stabil auf die Tochterzellen vererbt und die das Plasmid enthaltenden Zellen können über Neomycin selektioniert werden. Außerdem lassen sich die Zellen über das vom Plasmid kodierte eGFP durch grüne Lichtemission erkennen (siehe Abb. 3.28). Diese Experimente wurden in HEK-293wt-Zellen durchgeführt, da die HEK-293T-Zellen bereits resistent gegenüber Neomycin sind.

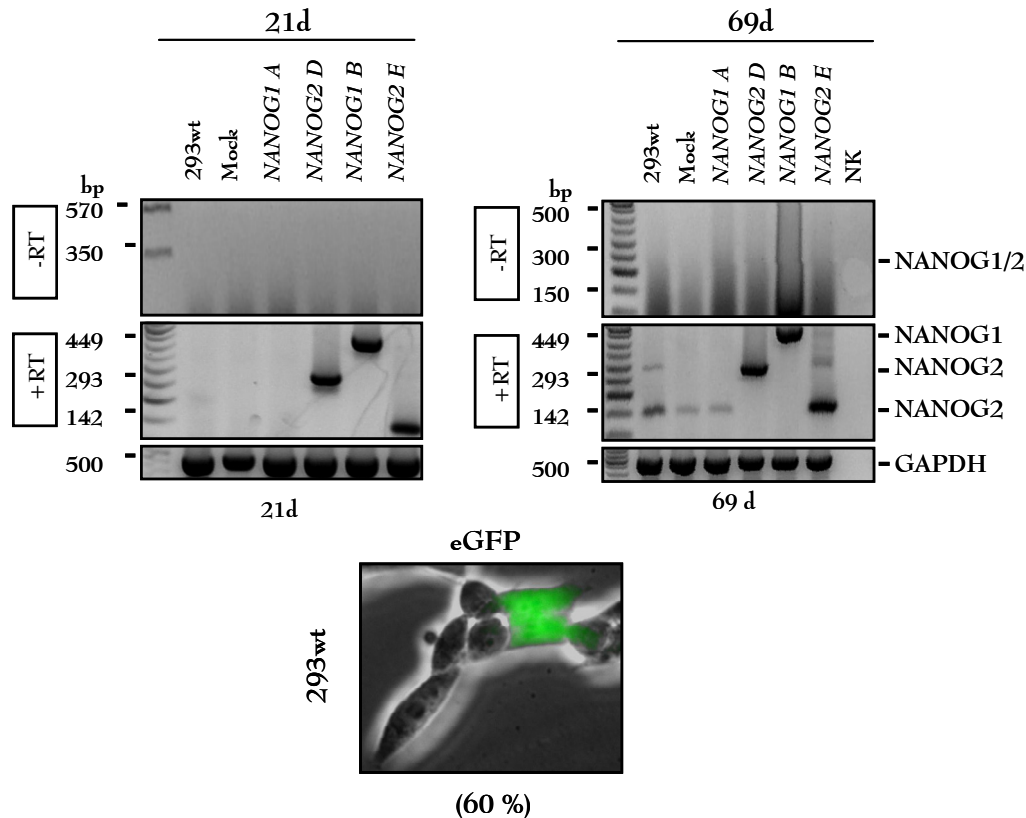


Abb. 3.28: Überprüfung der Expression von *NANOG1 A, B, NANOG2 D* und *NANOG E* in HEK-293wt-Zellen.

Nachweis der Transkription von *NANOG1 A, B, NANOG2 D* und *E* 21 und 69 Tage nach der Transfektion mittels der RT-PCR und der eGFP-Fluoreszenz, die vom gleichen Plasmid kodiert wird. 60% der Zellen fluoreszierten grün. -RT: gDNA Kontaminationskontrolle mit gleichen Oligonukleotiden, die für den NANOG-Nachweis eingesetzt wurden (+RT). GAPDH: Bezugskontrolle. Mock: HEK-293wt-Zellen (293wt) transfiziert mit leerem pEPI-eGFP-Vektor. M: 50 bp Marker, λ -ClaI-Marker, NK: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), bp: Basenpaare, d: Tage.

Alle zu untersuchenden HEK-293wt-Zellen wiesen nach etwa 3 Wochen eine Transfektionseffizienz von etwa 60 % auf. Die Zellen wurden durch RT-PCR- und Western-Blot-Analysen auf *NANOG1/2*-Transkription und -Expression überprüft. Für den Transkriptionsnachweis wurde ein Oligonukleotidpaar gewählt, welches im Exon 1 und Exon 4 von *NANOG1/2* bindet, um den Nachweis von endogenen *NANOG*-Transkripten zu vernachlässigen. Das *NANOG1 A*-Transkript war mit diesem Primerpaar jedoch nicht nachweisbar, da es kein Exon 1 enthält. Alle anderen Transkripte konnten sowohl nach 21 Tagen als auch nach 69 Tagen der Selektion noch detektiert werden. Da

der Nachweis der *NANOG1* A-Variante mit der RT-PCR nicht erbracht werden konnte, wurde der Western Blot durchgeführt.

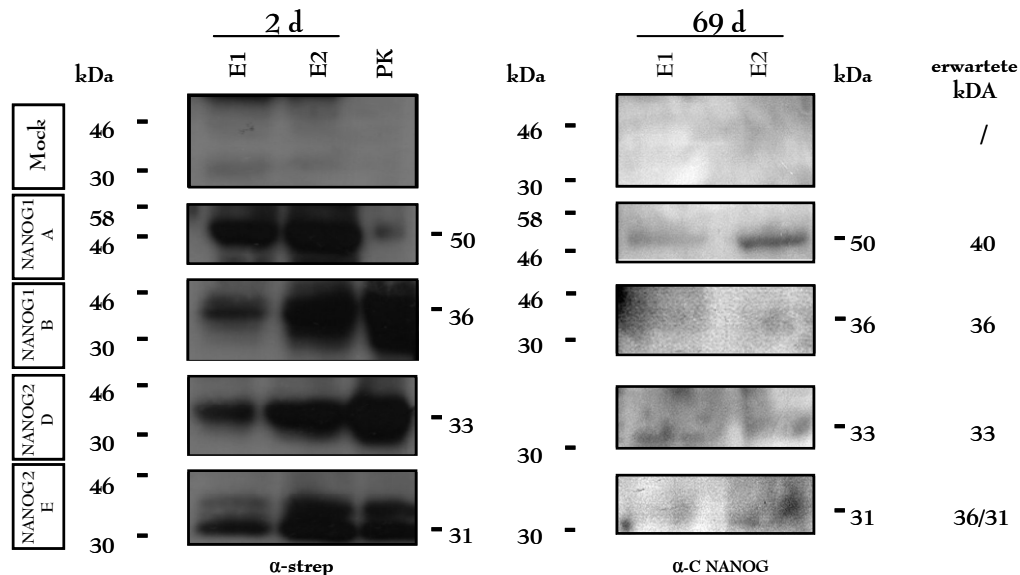


Abb. 3.29: Überprüfung der NANOG-Expression in HEK-293wt-Zellen mittels Western Blot.

Nachweis der Proteine NANOG1 A, B, NANOG2 D und E 2 und 69 Tage nach der Transfektion mittels der Strep- und der C-terminalen NANOG-Antikörper. Die Proteine wurden über die Strep-Säule aufgereinigt und die beiden Elutionsproben wurden analysiert. Als positive Kontrollen (**PK**) für den Western Blot wurden bereits gereinigte Proteine eingesetzt. Mock: HEK-293wt-Zellen transfiziert mit leerem pEPI-eGFP-Vektor. **kDa**: Kilodalton, **d**: Tage, **E**: Elutionsprobe, verwendeter Marker: Prestained Protein Marker.

Die Proteine wurden mit Hilfe des Strep-Tags aufgereinigt, in zwei Elutionsproben (E1 und E2) aufgenommen und analog zu den vorher beschriebenen Experimenten sowohl mit dem Strep- als auch mit dem C-terminalen NANOG-Antikörper in beiden Elutionsproben analysiert (siehe Abb. 3.29). Zur Orientierung wurde eine positive Kontrolle mitgeführt. Alle Proteinvarianten wurden sowohl am Anfang als auch nach 69 Tagen von den Zellen noch produziert.

3.4.1.2 Analyse des Genexpressionsprofils epigenetischer Gene mittels des cDNA Micro-Arrays

In der ersten Genexpressionsanalyse wurde die cDNA der 21 Tage alten NANOG1/2-exprimierenden HEK-293wt-Zellen in einem cDNA Micro Array überprüft, der über 200 epigenetisch wichtige Gene untersucht. Mit Hilfe dieser PCR-Methode wurde die aktive

Gentranskriptionsveränderung der NANOG-produzierenden Zellen bezogen auf die Gentranskription der Mock-Zelllinie quantitativ vermessen.

Ein Vergleich der dabei untersuchten Gene mit den von Boyer *et al.* publizierten NANOG1-Targetgenen ergab eine übereinstimmende Zahl von 12 Genen, deren Transkription normalerweise in ES-Zellen von NANOG1 reguliert wird (siehe Tabelle1). Trotz der NANOG1 A-Überexpression zeigten jedoch nicht alle Targetgene eine Transkriptionsveränderung.

Genname	293wt E	NANOG1 A E(-fach)	NANOG1 B E(-fach)	NANOG2 D E(-fach)	NANOG2 E E(-fach)
ARID1B	1,12	2,03 (1,8)	1,93 (1,7)	0,83	1,28
CHD2	0,38	2,01 (5,3)	0,73 (1,9)	0,84 (2,2)	0,73 (1,9)
HELLS	1,27	1,75	1,24	1,38	1,9
MORF4L1	0,99	1,12	0,79	1,11	1,46
MORF4L2	0,73	1,16	0,92	1,13	1,32 (1,8)
NCOR1	0,9	1,31	1,28	1,43	1,54 (1,7)
RAD54B	0,8	0,82	0,96	0,86	1,34
RBBP4	0,71	0,91	0,82	0,95	1,10
SMARCA3	0,66	0,89	0,69	0,86	1,11
SMARCA1	0,87	1,2	0,86	1,00	1,31
TTF2	0,64	0,98	0,7	0,83	1,14
ZRANB3	0,3	0,69(2,3)	0,62(2,1)	0,52(1,7)	0,6 (2)

Tab. 1: NANOG1-Targetgene, die im Micro-Array untersucht wurden.

Analysiert wurden die aktive Transkription der dargestellten Gene in HEK-293wt-Zellen, transfiziert für 21 Tage mit *NANOG1 A*-, *B*-, *NANOG2 D*- oder *NANOG E*-Vektoren. Die Expression wurde auf den Genexpressionswert der Mock-Kontrolle bezogen. Die in Klammern dargestellten Zahlen sind die x-fachen Hochregulierungen gegenüber den Genexpressionswerten der HEK-293wt-Kontrolle (293wt). E: Expressionswert

Die Gene *CHD2* und *ZRANB3* wiesen in den transfizierten Zellen die meiste Transkriptionsveränderung im Vergleich zu HEK-293wt-Zellen auf. Die Gentranskription von *CHD2* war in den Zellen, die NANOG1 A exprimierten sogar 5,3-fach höher als vom Wildtyp. Andere NANOG1-Targetgene schienen ebenfalls eine etwas stärkere Transkriptionsrate aufzuweisen, wie zum Beispiel *ARID1B*, *HELLS*, *MORF4L2*, *NCOR1* und *SMARCA1*.

Viele der im Test ermittelten Gene, die nicht in der Liste der NANOG1-Targetgene vorzufinden waren, zeigten ebenfalls Gentranskriptionsunterschiede und wurden aus diesem Grund in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Genname	293wt E	NANOG1 A E(-fach)	NANOG1 B E(-fach)	NANOG2 D E(-fach)	NANOG2 E E(-fach)
ACTL61	0,69	1,33 (1,9)	0,68	1,03	1,28 (1,9)
ARID1A	0,5	1,08 (2,16)	0,7	0,69	1 (2)
ARID1B	1,12	2,03 (1,8)	1,93 (1,7)	0,83	1,28
ASH2L	0,5	0,93 (1,9)	0,72	0,76	0,86 (1,7)
BPTF	0,59	1,29 (2,2)	0,7	0,87	0,81
BRD8	0,65	1,44 (2,2)	0,98	0,98	1,3 (2)
CECR2	0,63	1,77 (2,8)	1,03	1,43 (2,3)	1,81(2,9)
CHAF1A	0,55	1,33(2,4)	0,62	0,78	0,96 (1,7)
CHD5	0,29	2,24 (7,7)	1,08 (3,7)	1,24(4,3)	0,96 (3,3)
CHD9	0,73	1,53 (2,1)	0,87	1,11	1,36 (1,9)
DNMT3B	1,05	1,71	0,94	1,44	1,46
ERCC6	1,09	2,32 (2,1)	1,65	1,90	2,06 (1,9)
MBD6	0,47	0,87 (1,9)	0,91 (1,9)	0,96 (2)	1,04 (2,2)
MYST2	0,61	1,2 (2)	0,9	1,02	1,41 (2,3)
NCOR2	0,64	1,26 (2)	0,79	0,94	1,31 (2)
PHF21A	0,34	0,58 (1,7)	0,6 (1,8)	0,67 (2)	0,69 (2)
SMARCA1	0,32	0,89 (2,8)	0,88 (2,8)	0,79 (2,5)	0,83 (2,6)
SMARCA2	0,46	0,99 (2,2)	0,78	0,9 (2)	1,13 (2,5)
SUPT3H	0,4	0,88 (2,2)	0,79 (2)	0,96 (2,4)	0,88 (2,2)
TADA3L	0,49	0,98 (2)	0,83(1,7)	1,05(2,1)	1,05 (2,1)
TRRAP	0,84	0,97	1,49 (1,8)	1,15	2,61 (3,1)

Tab. 2: Darstellung der im Micro-Array untersuchten Gene mit veränderten Genexpressionen.

Analysiert wurden die Transkription der dargestellten Gene in HEK-293wt-Zellen, transfiziert für 21 Tage mit *NANOG1 A*-, *B*-, *NANOG2 D*- oder *NANOG E*-Vektoren. Die Expression wurde auf den Genexpressionswert der Mock-Kontrolle bezogen. Die in Klammern dargestellten Zahlen sind die x-fachen Hoch- oder Herunterregulierungen gegenüber den Genexpressionswerten der HEK-293wt-Kontrolle (293wt).

Den größten Unterschied zwischen transfizierten Zellen und dem Wildtyp wies das Gen *CHD5* in seiner Transkription auf. Es war je nach der exprimierten NANOG-Proteinvariante 7,7- bis 3,3-fach höher transkribiert. Die meisten anderen Gene zeigten eine 1,8-3,1-fache Transkriptionsrate gegenüber dem Wildtyp. Die auffälligsten Gene waren *CECR2*, *MBD6*, *PHF21A*, *SMARCA1/2* und *SUPT3H*, die in allen Zelllinien mit den unterschiedlichen Proteinvarianten stärker transkribiert waren. Viele der Gene schienen nur von NANOG1 A und NANOG2 E reguliert zu sein, da nur bei ihnen eine

höhere Transkriptionsrate detektiert wurde. Zu diesen Genen zählten *ARID1A*, *ASH2L*, *BRD8*, *CHAF1A*, *CHD9*, *ERCC6*, *MYST2* und *NCOR2*. Einige der Gene schienen nur von einem der Proteinvarianten reguliert zu sein. Das Gen *TRRAP* zeigte z.B. eine höhere Transkription in Zellen mit der Proteinvariante NANOG2 E und NANOG1 B. Die Gene *ARID1B* und *BPTF* wurden dagegen von der Variante NANOG1 A in ihrer Transkription aktiviert.

3.4.1.3 Verifizierung der Expressionsdaten mittels der RT-PCR

Eines der in ES-Zellen hochregulierten Faktoren ist DNMT3B. Dieser Faktor scheint für die ES-Zellen bedeutend zu sein, denn seine Transkription blieb bislang nur auf diese Zellen beschränkt. In gewebespezifischen Stammzellen konnte seine Transkription *bis dato* nicht detektiert werden.

Umso interessanter war das Ergebnis dieser Analyse, da in Zellen mit NANOG1 A-, NANOG2 D- und NANOG2 E-Expression die Transkription von *DNMT3B* gegenüber dem Wildtyp etwas hochreguliert war.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die cDNA von 50 Tage lang selektierten HEK-293wt-Zellen (50d) in RT-PCR-Experimenten eingesetzt.

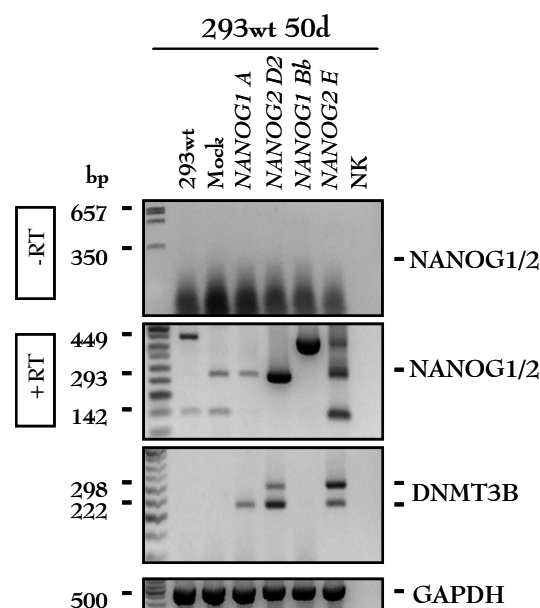


Abb. 3.30: Überprüfung der aktiven Transkription von *DNMT3B* in mit NANOG1/2-exprimierten HEK-293wt-Zellen.

Detektion der unterschiedlichen alternativen Spleißvarianten von *NANOG1* und *NANOG2* und des Transkripts von *DNMT3B* 50 Tage nach der Transfektion der *NANOG1* A-, *NANOG2* D- und E-Vektoren in die HEK-293wt-Zellen mittels der RT-PCR-Experimente. –RT: gDNA Kontaminationskontrolle mit gleichen Oligonukleotiden, die für den *NANOG*-Nachweis eingesetzt wurden (+RT). GAPDH: Bezugskontrolle. Mock: HEK-293wt-Zellen (293wt) transfiziert mit leerem pEPI-eGFP-Vektor. **M**: 50 bp Marker, λ -ClaI-Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp**: Basenpaare, **d**: Tage

Die Zellen, die die Proteinvarianten *NANOG1* A, *NANOG2* D und *NANOG2* E exprimierten, zeigten tatsächlich eine höhere Transkription des *DNMT3B*-Gens.

Parallel dazu wurde die *DNMT3B*-Transkription in AML- und ALL-Patienten und t(4;11)-Zelllinien analysiert. Sowohl die Zelllinien NTERA-2, SEM und RS4;11 als auch die Mehrheit der AML- und ALL-Patienten transkribierten das Gen *DNMT3B*. Erstaunlicherweise wiesen die gleichen Patienten *DNMT3B*-Transkripte auf, die auch *NANOG1* oder *NANOG2* transkribierten. Die Ausnahme waren die t(4;11)-Patienten. In der cDNA-Probe 2669 eines t(4;11)-Patienten konnte zwar *NANOG2*- aber kein *DNMT3B*-Transkript nachgewiesen werden. Gesunde Probanden transkribierten außer in einem Fall kein *DNMT3B*. Die Ausnahme bildete der dritte Proband, bei dem bereits zuvor eine schwache *NANOG2*-Bande sichtbar gewesen war.

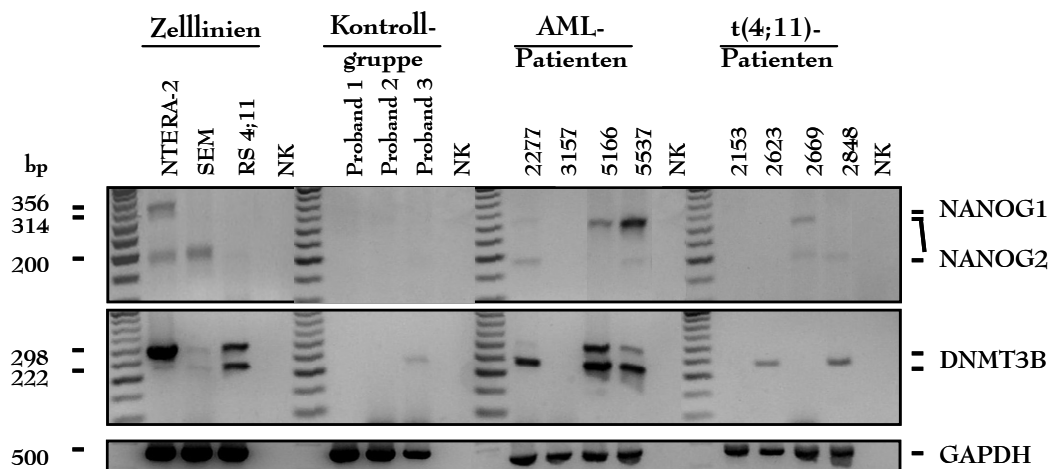


Abb. 3.31: Überprüfung der *DNMT3B*-Gentranskription in Zelllinien, in AML- und ALL-Patientenzellen.

Detektion der unterschiedlichen alternativen Spleißvarianten von *NANOG1*, von *NANOG2* und des Transkripts von *DNMT3B* in den Zelllinien NTERA-2, SEM, RS4;11 und in den Zellen aus dem peripheren Blut von vier AML- und vier ALL-Patienten mittels der RT-PCR. Zur Kontrolle wurden die Zellen aus dem peripheren Blut von drei gesunden Probanden überprüft. GAPDH: Bezugskontrolle. **M**: 50 bp Marker, λ -ClaI-Marker, **NK**: Negativkontrolle (Wasserkontrolle), **bp**: Basenpaare.

3.4.1.4 Genexpressionsanalyse mit einem Affymetrix Micro-Array

Mit Hilfe eines zweiten Affymetrix Micro-Arrays sollten weitere Analysen zu veränderten Expressionsmustern erbracht werden, die durch die NANOG1- und NANOG2-Proteinvarianten in den HEK-293wt-Zellen hervorgerufen wurden. Der Affymetrix-Micro-Array basiert auf der Überprüfung des gesamten humanen Transkriptoms. Der dabei benutzte CHIP enthält Sonden vieler humaner Gene, an welche sich die cDNA aus den zu untersuchenden Zellen anlagern kann. Vor der CHIP-Hybridisierung wurde aus diesem Grund die Qualität der RNA auf genomische Verunreinigung geprüft und als rein sichergestellt.

Das Genexpressionsmuster der Zelllinien HEK-293wt/NANOG1 A, HEK-293wt/NANOG2 D und HEK-293wt/NANOG2 E wurden mit der Mock-Zelllinie HEK-293wt/pEPI-eGFP verglichen.

Die Zellen, die NANOG1 A oder NANOG2 E synthetisierten, hatten 16 Gene 2-5fach hochreguliert. In Zellen mit NANOG2 D-Expression waren nur 7 Gene 2-5fach hochreguliert. Eine 2-5fache Runterregulierung der Gene war bei den Zellen HEK-293wt/NANOG2 E zu erkennen (siehe Anhang). Viele der hochregulierten Gene sind beteiligt am Zellzyklus, Signalwegen, Apoptose, Transkriptionsregulation und Cytoskelett.

Bei dieser Analyse konnten außerdem zwei Gene identifiziert werden, die alle untersuchten NANOG-produzierenden Zellen gemeinsam hatten. Eines der Gene war *FOS*, welches für ein Proto-Onkogen kodiert und am Zellzyklus beteiligt ist und das zweite Gen war *EGR1*, welches für ein Zinkfingerprotein kodiert.

NANOG1A	LU	log2	NANOG2D2	LU	log2	NANOG2E	LU	log2
FOS	857	+5,3	FOS	646	+4,9	FOS	832	+4,9
EGR1	803	+3,4	EGR1	386	+2,5	EGR1	672	+3,3
EGR1	2992	+2,6	EGR1	2165	+2,3	EGR1	2377	+2,7
CCND2	1288	+2,3						

7 Gene (2-5fach) hochreguliert 16 Gene (2-5fach) hochreguliert
19 Gene (2-4fach) runterreguliert

Abb. 3.32: Darstellung der in allen Zelllinien hochregulierten Gene.

HEK-293wt-Zellen, die NANOG1 A, NANOG2 D und NANOG2 E exprimierten, hatten zwei Gene gemeinsam, die sie hochregulierten. LU: Lumineszenzeinheiten.

Trotz des trunkeierten N-Terminus der NANOG2-Proteine zeigen demnach alle NANOG-Proteine eine gleichgerichtete Regulation von einigen Genen, deren Produkte entscheidende Regulationsprozesse in der Zelle steuern. Besonders die Proteine NANOG1 A und NANOG2 E regulieren eine Vielzahl gleicher Gene und zeigen somit die größte Veränderung in der Genexpression.

4 Diskussion

Der embryonale Stammzellfaktor NANOG1 ist bereits 2003 als ein sehr wichtiger Regulator in der embryonalen Entwicklung identifiziert worden, der grundlegend an der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und der Pluripotenz der ES-Zellen beteiligt ist (Chambers *et al.*, Mitsui *et al.*, 2003). Gleichzeitig konnte eine NANOG1-Expression auch in Keimzelltumoren, wie Teratomas oder Seminomas, und in Krebsstammzellen einiger Tumore detektiert werden (Ezeh *et al.*, 2005 Clark 2007). Die Zellen dieser Tumore wiesen Stammzellcharakteristika auf, teilten sich ununterbrochen und waren resistent gegenüber der Apoptose. Den Ergebnissen zufolge könnte NANOG1 in den Krebsstammzellen weiterhin Aktivität aufweisen und für die Etablierung der Stammzellcharakteristika entscheidend sein. Zumindest dem murinen Nanog-Protein wurde bereits eine entscheidende Rolle bei der Tumortransformation und der Tumormetastasierung zugeschrieben (Tanaka *et al.*, 2007). Die Transplantation einer hämatopoetischen Stammzelle mit ektopischer Nanog-Überexpression in murine Embryonen führte nämlich zu einer Überschwemmung von Nanog-exprimierenden T-Zellen, einer Störung der Blutzellbildung und einer Thymusatrophie. Die T-Zellen, die Nanog überexprimierten, konnten zudem außerhalb des Thymus detektiert werden.

Bis dato konnte jedoch keine NANOG1-Expression in Gewebestammzellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, adulten differenzierten Zellen oder in Tumoren ohne Krebsstammzellen nachgewiesen werden. Umso interessanter war die Studie von Gaussmann *et al.* in der eine 16-fache *Nanog*-Hochregulierung in murinen embryonalen Fibroblastenzellen (MEF) nachgewiesen wurde, nachdem in diese Zellen die beiden Fusionsproteine einer t(4;11)-Translokation angeschaltet wurden. Einige Symptome und Eigenschaften der akuten lymphatischen Leukämie sprechen für die Existenz von Stammzell-ähnlichen Tumorzellen (Le Viseur *et al.*, 2008). Eines der Argumente ist die schlechte Überlebenschance der Patienten mit einer t(4;11)-assoziierten Leukämie und dass diese Erkrankung als nahezu therapieresistent ist. Interessanterweise zeigen Patienten mit anderen Tumoren, in denen NANOG1 aktiv ist, eine ebenso geringe Überlebensrate (Chiou *et al.*, 2008; Ezeh *et al.*, 2005). Außerdem ist die Therapieresistenz oft eine typische Eigenschaft der Stammzellen, denn sie besitzen viele

Membrantransporter, die die Zelle von Toxinen säubern und dadurch Therapieresistenz verleihen.

Eine weitere für die Existenz von Stammzell-ähnlichen Zellen sprechende Eigenschaft ist die erneute Leukämieherbivorrufung in Rezipienten, in die das Blut einer an akuter lymphatischer Leukämie erkrankter Maus transplantiert wurde (Le Viseur *et al.*, 2008). Diese Studie konnte zeigen, dass alle t(4;11)-Tumorzellen unabhängig von ihrem Reifegrad bzw. ihren Oberflächenmarkern eine Leukämie auslösen konnten. Nichtsdestotrotz müssten die Zellen, die erneut eine Leukämie hervorrufen, stammzellähnliche Eigenschaften besitzen, wie die ununterbrochene Selbsterneuerung und die schnelle Anpassung an unterschiedliche Gewebe. Gerade diese Eigenschaften müssten zunächst durch eine veränderte Genexpression etabliert werden. Zu den Faktoren, die ein Genprofil einer Zelle ändern können, zählt unter anderem der Faktor NANOG1, der die Chromatinumgestaltung, die Differenzierung der Zelle und die Proliferation reguliert. Außerdem wird NANOG1 die Fähigkeit zugeschrieben, die Erodierung der epigenetischen Information und somit die Demethylierung der DNA zu regulieren, was ebenfalls eine Genprofiländerung einer Zelle hervorruft (Chamber *et al.*, 2007). In Krebszellen konnte bereits häufiger das Chromatin in einem demethylierten Zustand nachgewiesen werden, was folglich auf die Regulation der Tumorzellen durch das NANOG1-Protein oder durch andere Stammzellfaktoren deutet (Feinberg *et al.*, 1988).

Falls NANOG1 tatsächlich die beschriebenen Eigenschaften aufweist, so kann die t(4;11)-Translokation und eine NANOG1-Expression eine stammzellähnliche Zelle etablieren, die wie andere Stammzellen die Fähigkeit zur unlimitierten Proliferation und Migration erlangen kann.

Es ist daher von hohem Interesse sowohl die Stammzell-ähnlichen Zellen als auch die für die Tumortransformation verantwortlichen Faktoren zu erforschen.

In dieser Arbeit wurde folglich die NANOG-Expression in t(4;11)-Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie und in humanen t(4;11)-Zelllinien auf Genom- und Proteinebene analysiert.

4.1 Identifikation der neuen *NANOG1*- und *NANOG2*-Genstrukturen und der regulatorischen Regionen vor den beiden Genen.

Bei der Untersuchung des Stammzellfaktors haben die unterschiedlichen Studien bislang nicht bewusst zwischen der *NANOG1*-Transkription und der Transkription seiner Pseudo-/Retrogene unterschieden, da die Einstellung vertreten wurde, dass diese zwar transkribiert werden, aber keine funktionellen Proteine erzeugen würden (Hart *et al.*, 2004; Booth and Holland, 2004).

Es konnten jedoch Transkripte von Pseudo-/Retrogenen in verschiedenen Tumorzellen oder Zelllinien nachgewiesen werden. Dazu zählen die Pseudogene *NANOGP2*, *NANOGP4*, *NANOGP5*, *NANOGP7* und das Retrogen *NANOGP8* (Booth and Holland, 2004; Zhang *et al.*, 2006). In ES-Zellen und embryonalen Karzinomazellen konnte außerdem neben *NANOG1*-Transkripten ebenfalls das Transkript von *NANOG2* schwach detektiert werden, welches über eine siRNA herunterreguliert werden konnte (Hart *et al.*, 2004; Hyslop *et al.*, 2005). Außerdem wurden ESTs von *NANOG2* aus der Testis und ein weiteres *NANOG2*-Transkript aus dem Pankreastumor isoliert (Hart *et al.*, 2004; Booth and Holland, 2004). Auch in dieser Arbeit konnten Transkripte von *NANOG2* in embryonalen Karzinomazellen detektiert werden. Außerdem wurden ausschließlich *NANOG2*-Transkripte zum ersten Mal auch in unterschiedlichen Tumorzelllinien, in Blutproben von ALL-/AML-Patienten und in den hämatopoetischen Stammzellen (CD34+) nachgewiesen. Diese Ergebnisse galten bisher als unwahrscheinlich, da in keiner der Studien jemals *NANOG*-Transkripte in Gewebestammzellen nachweisbar waren (Ramalho-Santos *et al.*, 2002; Ivanova *et al.*, 2002).

Das zweite für ein funktionelles Protein kodierende Gen *NANOGP8* wurde hingegen in keinem der mit RT-PCR-Experimenten untersuchten Zellpopulationen transkribiert. Somit scheint nur das Gen *NANOG2* transkribiert zu werden. Das Gen wurde jedoch zu schwach transkribiert. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass viele Studien die Transkripte von *NANOG2* übersehen hatten. Viele dieser Studien verwenden für die Detektion oft den Northern Blot, deren Sensitivitätsgrenze weit oberhalb der Grenze von der RT-PCR liegt. In murinen Geweben konnte zumindest *Nanog* nur mit der RT-PCR und nicht mit dem Northern Blot detektiert werden (Hart *et al.*, 2004).

Die Transkription von Pseudo-/Retrogenen ist nicht sehr unwahrscheinlich, denn auch im Fall von *OCT4* wurden Pseudogentranskripte im humanen Tumorgewebe detektiert (Suo *et al.*, 2005). Bislang ist die Funktion der *OCT4*-Pseudo-/Retrogene in Krebszellen jedoch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass es die *OCT4*-Genaktivität reguliert und damit die Kanzerogenese fördert. Ein weiterer Stammzellfaktor, Dppa3 besitzt viele Pseudo-/Retrogene, deren Transkripte im Knochenmark, peripheren Blut, im Pankreas und in der Nebenniere schwach detektiert wurden, wobei deren Funktion noch nicht bestimmt werden konnte (Elliman *et al.*, 2006). Einige Pseudo-/Retrogene anderer Gene haben im Verlauf der Zeit sogar gewisse wichtige Funktionen übernommen. Das Rhodopsin der Knochenfische wird von einem Retrogen kodiert und übernimmt die gleiche Funktion wie das echte Gen in anderen Tierarten (Bellingham *et al.*, 2003). Auch post-transkriptionelle Regulationen der Gene über Pseudo-/Retrogene wurden beobachtet (Korneev *et al.*, 1999; Hirotsune *et al.*, 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Transkripte von *NANOG1* und *NANOG2* entsprachen jedoch nicht den bisher beschriebenen Transkripten. Zudem konnten neue Exons entdeckt werden, die vor den bekannten Exons 1-4 lagen. Folglich wurden die Exons beider *NANOG*-Gene neu durchnummeriert. Außerdem wurden beim Spleißen bislang unbekannte Spleißstellen benutzt, die bislang nicht beschrieben wurden. Hart *et al.* und Booth und Holland wiesen zwar auf einige ESTs von *NANOG1*- und *NANOG2*-Genen hin, die den gefundenen Transkripten entsprechen, gingen aber nicht vertieft auf diese Spleißvariationen ein. Eines der beschriebenen ESTs von *NANOG2* beinhaltete z.B. das neue Exon 1. Die ESTs wiesen außerdem im Exon 3 (*alias* Exon 1) eine Deletion von 16 bp auf, was in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen ebenfalls entsprach. Alle bisherigen Studien schienen diesen Spleißvarianten keine Bedeutung beizumessen.

Zum Teil sprachen beide Studien den gefundenen ESTs wenig Sinn zu, da sie von *NANOG2* stammen und dieses Gen anscheinend kein funktionelles Protein liefern würde. Da *NANOG2* aber 97 % Homologie zu *NANOG1* aufweist und außerdem einen offenen Leserahmen besitzt, wäre eine Proteinbildung und eine äquivalente Funktion zu *NANOG1* sogar sehr wahrscheinlich.

Durch die 5'RACE-Untersuchung konnten außerdem einige der von *NANOG1* und *NANOG2* stammenden Transkripte besser analysiert werden. Die neuen Exons liegen nicht wie von Hart *et al.* beschrieben etwa 20000 bp, sondern nur etwa 2000 bp aufwärts von dem ehemaligen Exon 1. Weiterhin spleißen drei Exons (Exon 1a-1c) alternativ zu Exon 2 oder Exon 3. In der Maus sind ebenfalls drei alternative Transkriptionsstartpunkte 1a-1c von *Nanog* beschrieben worden, was darauf hindeutet, dass alternative Transkriptionsstartpunkte keine Seltenheit sind (Hart *et al.*, 2004). Bislang konnte die Bedeutung dieser alternativen Startpunkte nicht definiert werden.

Beim Spleißen von *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripten können im Exon 3 drei alternative Spleißakzeptorstellen und im Exon 4 zwei alternative Spleißakzeptorstellen angesteuert werden. Somit entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher Transkriptvarianten, die für die Synthese von mindestens 5 unterschiedlichen Proteinvarianten genutzt werden können.

Für die Synthese der neuen Transkripte müssten demnach zwei Promotoren aktiv sein. Die ChIP-Analysen und die Reportergenexperimente weisen daraufhin, dass vor Exon 3 von beiden Genen ein Promotor liegt. Diese Promotoren scheinen jedoch nur in embryonalen Stammzellen oder embryonalen Karzinomazellen aktiv zu sein. In nicht-embryonalen Zellen ist der Promotor vor Exon 3 sowohl von *NANOG1* als auch von *NANOG2* durch die H3K9-tri-Methylierung deaktiviert. Aus diesem Grund können Transkripte von *NANOG2* oder *NANOG1*, die mit Exon 3 beginnen nur in embryonalen Zellen detektiert werden. Ein weiterer zusätzlicher Promotor wurde zwischen Exon 1 und Exon 2 von *NANOG1* mit Hilfe des Reportergenexperiments bestimmt. Dieser scheint nur in NTERA-2-Zellen aktiv zu sein, da in HeLa-Zellen keine Luziferaseaktivität gemessen werden konnte. Für die Aktivierung dieses Promotors werden vermutlich Stammzellfaktoren benötigt, die ausschließlich in embryonalen Zellen vorhanden sind.

Ein definitiver Promotor vor Exon 1 von *NANOG1* oder *NANOG2* konnte zwar bislang nicht präzise kartiert, aber wichtige regulatorische Regionen konnten gefunden werden. Diese werden durch die tri-Methylierungen der Histonproteine reguliert. Mehrere aktivierende H3K4-tri-Methylierungen im Exon 1-Bereich von *NANOG2* konnten in nicht-embryonalen Zelllinien mit t(4;11)-Translokation nachgewiesen werden. Diese Methylierungen ermöglichen die Transkription des *NANOG2*-Gens. Im Vergleich dazu

wurde vor Exon 1 von *NANOG1* zwar eine Bindung der RNA-Polymerase II, aber keine H3K4-tri-Methylierung und folglich keine *NANOG1*-Transkription in t(4;11)-Zellen gefunden. Vermutlich ist die stärkere H3K9-tri-Methylierung von *NANOG1* der entscheidende Faktor bei der Reprimierung der Transkription. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Chromatinveränderungen bei der *NANOG1*-Expression von wichtiger Relevanz sind (Deb-Rinker *et al.*, 2005).

Somit scheinen in embryonalen Zellen zwei Promotoren sowohl vor *NANOG1* als auch vor *NANOG2* und in nicht-embryonalen Zellen ausschließlich der Promotor vor Exon 1 des *NANOG2*-Gens aktiv zu sein.

4.2 Untersuchung der NANOG-Expression

Entgegen den bisherigen Vermutungen können die Transkripte von *NANOG2* in Proteine übersetzt werden. Dabei entstehen 2 unterschiedliche *NANOG1*- und 3 unterschiedliche *NANOG2*-Proteinvarianten. Alle dafür verwendeten Start-Codons liegen im offenen Leserahmen der beiden *NANOG*-Gensequenzen. Im Falle von *NANOG2* liegen diese Start-Codons hinter dem im Exon 3 liegenden Stop-Codon. Da beim Spleißen zu Exon 3 in *NANOG1* oder *NANOG2* entweder 2, 5 oder 16 bp und somit das Start-Codon wegfallen, werden auch im Fall von *NANOG1* andere abwärts liegenden ATGs für die Proteinsynthese verwendet. Dadurch entstehen Proteine mit verkürzten N-Termini. Während im murinen System sowohl der N- als auch der C-Terminus jeweils eine Transaktivierungsdomäne gefunden werden konnte, findet man im humanen *NANOG*-Protein nur im C-terminalen Bereich eine Transaktivierungsdomäne (Pan and Pei, 2005; Oh *et al.*, 2005). Somit müsste die Reduzierung der N-terminalen Domäne keine nachteilige Auswirkung auf die Funktion der verschiedenen *NANOG*-Proteinvarianten haben. Den Ergebnissen zufolge ist der Startpunkt der Transkripte in beiden *NANOG*-Genen somit funktionell unbedeutend.

Das *NANOG2*-Gen weist außerdem einige Mutationen auf, die sich aber alle im N-Terminus befinden. Nur drei Missense-Mutationen befinden sich in den Bereichen, die für die funktionalen Domänen kodieren, wobei zwei der Mutationen zwar verschieden zu der homologen Sequenz von *NANOG1* aber nicht zum murinen *Nanog*-Gen sind. Die Domänen dürften demnach ihre Funktion nicht verloren haben.

In den Lysaten der NTERA-2 und der SEM-Zelllinie konnten tatsächlich mehrere Proteinbanden zwischen 48 und 21 kDa in Western Blot-Experimenten detektiert werden, wobei es sich nicht um Proteinabbaubanden handelt, denn trotz der Zugabe des Proteasominhibitors MG132 waren die Banden weiterhin vorhanden.

In beiden Zelllinien entsprachen einige der Bandengrößen den von *NANOG2*-kodierenden Proteingrößen, wie z.B. der *NANOG2*-Variante D und E. In der embryonalen NTERA-2-Zelllinie sind weitere Proteinbanden detektiert worden, die im SEM-Zelllysat fehlten und vermutlich *NANOG1*-Proteine darstellen. Eine der nur im NTERA-2-Zelllysat detektierten Bande lief im SDS-PAGE bei etwa 45 kDa. Es müsste sich um die Proteinvariante *NANOG1 A* handeln, deren Molekulargewicht eigentlich 35 kDa beträgt. Diese Diskrepanz von 10 kDa konnte ebenfalls bei der rekombinanten Expression der *NANOG1 A*-Proteinvariante in HEK-293T-Zellen in Western Blot-Experimenten gezeigt und durch die MALDI-Analyse validiert werden.

Bislang wurden keine Proteinmodifikationen für das humane *NANOG*-Protein beschrieben. Das murine Pendant dazu ist mit einer Phosphatgruppe ausgestattet. In dieser Arbeit durchgeführten Proteinmodifikationsanalysen konnten jedoch keine Phosphorylierungen in keiner der untersuchten *NANOG*-Proteinvarianten entdeckt werden. Auch Ubiquitinierungen oder Acetylierungen konnten experimentell ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der Programme SUMOplot™ Prediction und SUMOsp 2.0 konnte eine Konsensussequenz für die SUMO-Modifikation gefunden werden. Diese befindet sich im N-Terminus an einer Punktmutationsstelle von *NANOG2*. Damit könnten nur die *NANOG1*-Proteinvarianten sumoyliert sein. Das SUMO-Protein hat ein Molekulargewicht von 10 kDa. Interessanterweise läuft aber nur die *NANOG1 A*-Proteinvariante um 10 kDa höher im SDS-PAGE. Es ist daher anzunehmen aber bisher unbewiesen, dass diese Konsensussequenz tatsächlich für eine Sumoylierung verwendet wird. Leider ließ sich aus technischen Gründen eine Sumoylierung mit Hilfe von MALDI-MS nicht nachweisen. Auch der Nachweis mit SUMO-Antikörpern lieferte ungenaue Resultate. Der Antikörper detektierte *NANOG2*-Proteinvarianten, die kein SUMO tragen dürfen, da sie auf der erwarteten Höhe liefen. In der *NANOG2*-Proteinsynthese hätten zwar weiter abwärts liegende *bona fide* ATGs verwendet werden

und die Proteingröße dadurch um 10 kDa erleichtert werden können. Dies konnte jedoch durch MALDI-MS-Analyse ausgeschlossen werden.

Nichtsdestotrotz sind die Proteine modifiziert und laufen 10 oder 3 kDa höher als erwartet. Dies erklärt zumindest die Vielzahl der anderen Banden, die in NTERA-2- und SEM-Zelllysaten aufgetreten sind und höher als die erwarteten Größen im SDS-PAGE verliefen.

Da einige Proteinbanden der gereinigten Proteine ebenfalls verändertes Laufverhalten im SDS-PAGE zeigten, sind leichte Proteindegradierungen oder die Verwendung von anderen ATGs im offenen Leserahmen von NANOG ebenfalls möglich. Würde bei der Translation von NANOG1 A z.B. das zweite oder das fünfte ATG verwendet werden, so würden Proteine mit dem Molekulargewicht von 36 und 33 kDa entstehen, die in immunologischen Nachweisen ebenfalls detektiert wurden. Die Verwendung anderer *bona fide* ATGs ist nicht unwahrscheinlich, da sowohl die Sequenz um das zweite ATG als auch um das fünfte ATG zu 60-90 % mit der Kozakkonsensussequenz übereinstimmen. Die Sequenz um das fünfte ATG wäre sogar ein besserer Translationsstartpunkt als der bisher in der Literatur beschriebene Startpunkt. Auch die Verschiebung der NANOG2 D-Proteinbande um 2 kDa nach unten lässt sich durch ein alternatives Start-Codon erklären, denn diese Größe würde das Protein haben, wenn bei der Translation das dritte ATG in der Sequenz benutzt wäre. Dieses Start-Codon entspricht dem fünften ATG von NANOG1 A und wäre somit der beste Translationsstartpunkt in der Sequenz.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass NANOG-Proteine in verschiedenen Varianten in den unterschiedlichen Zelllinien exprimiert werden. Die unterschiedlichen Laufhöhen im SDS-PAGE sind demnach entweder auf transkriptionelle Varianten und zusätzlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen.

4.3 Regulation der Zelle über NANOG1 und NANOG2

Trotz der fehlenden N-terminalen Sequenz verfügen vier von fünf NANOG1/2-Proteinvarianten noch über alle für die unterschiedlichen Funktionen wichtigen Domänen. Nur bei der NANOG2 F-Proteinvariante fehlt das Signal für den Kernimport und die Hälfte der Homöodomäne, wodurch die Funktion dieses Proteins eingeschränkt

und verändert sein muss. Mit Hilfe der immunohistologischen Experimente konnte gezeigt werden, dass alle anderen Proteinvarianten jedoch in den Kern transportiert werden, wo sie ihre Funktionen entfalten können.

Zur Überprüfung, ob Zellen über Stammzellfaktoren reguliert werden, wurden einige der *NANOG1*-Targetgene in Zelllinien mit *MLL*-Translokation und in ALL/AML-Patienten untersucht, in denen *NANOG2*-Transkripte entdeckt worden sind. Viele der in ES-Zellen aktiven Gene wurden tatsächlich in den angesprochenen Zellen transkribiert. Die Gene wurden aber ebenso in gesunden Probanden transkribiert, wobei dies vielleicht auf die *NANOG2*-Aktivität in hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist. *NANOG2*-Transkripte konnten nämlich im gesunden Gewebe exklusiv nur in hämatopoetischen Stammzellen detektiert werden, wodurch möglicherweise das ES-Zellprogramm in hämatopoetischen Stammzellen aktiviert wird. Folglich konnten ebenfalls einige Gentranskripte, die im ES-Zellprogramm normalerweise von *NANOG1* kontrolliert werden, im Blut der gesunden Probanden nachgewiesen werden. Dass die *NANOG2*-Transkripte selber jedoch nicht in Blutproben der gesunden Probanden nachweisbar waren, könnte daran liegen, dass die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen im Blut der gesunden Probanden viel geringer ist als in der für die Gewebe-RT-PCR verwendete hämatopoetische Zellprobe.

In den Blutproben der ALL- und AML-Patienten konnten dagegen die *NANOG2*-Transkripte detektiert werden, obwohl die gleiche RNA-Menge von Patienten- und gesunden Probandenzellen in die RT-PCR-Experimente eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in Leukämiepatienten entweder mehrere Leukämiezellen das *NANOG2*-Gen anschalten oder vermehrt hämatopoetische Stammzellen im Blut der Patienten vorhanden sind. Nichtsdestotrotz scheinen in beiden Gruppen einige *NANOG1*-Targetgene transkriptionell aktiv zu sein, obwohl keine nachweisliche *NANOG1*-Expression in den Zellen detektiert werden konnte. Es ist daher nicht auszuschließen, dass *NANOG2* die Funktion von *NANOG1* teilweise übernehmen kann und *NANOG2*-Transkripte möglicherweise ebenfalls ein Indiz für Zellen mit Stammzeleigenschaften darstellen.

Erstaunlicherweise wurden die Transkripte der *NANOG1*-Targetgene bislang jedoch ausschließlich in ES-Zellen und niemals wie in dieser Arbeit in hämatopoetischen Zellen

detektiert. Dies könnte vermutlich auf die unterschiedlichen von den Studien durchgeführten Versuchsansätze zurückzuführen sein. Die Analyse der NANOG1-Targetgene in der anderen Studien basierte teilweise auf dem Vergleich der von Boyer *et al.* gewonnenen CHIP-Ergebnissen aus ES-Zellen mit den Genexpressionsprofilen von murinen hämatopoetischen und embryonalen Stammzellen (Boyer *et al.*, 2005, Ivanova *et al.*, 2002, Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Die Unterschiede in den Versuchsansätzen einerseits und die Unterschiede zwischen dem humanen und dem murinen Genexpressionsprofilen andererseits könnten zu Ungenauigkeiten und damit zu falschen Ergebnissen geführt haben. Somit könnten die ES-spezifischen Gene, spezifisch die NANOG1-Targetgene nicht nur exklusiv in ES-Zellen transkriptionell aktiv sein. In einer Studie wurde zumindest gezeigt, dass die NANOG1-Targetgene *REST*, *STAT3*, *MLLT10*, *Irx2* und *NFE2L3* sowohl in hämatopoetischen Stammzellen als auch in ES-Zellen hochreguliert sind, obwohl keine NANOG1-Expression detektiert wurde (Ivanova *et al.*, 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass das NANOG1-Targetgen *MEIS1* in hämatopoetischen Zellen hoch- und in ES-Zellen herunterreguliert wird (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Diese Beobachtung würde zumindest unsere Ergebnisse bestätigen, da *MEIS1* in den Blutproben aller ALL-Patienten und der gesunden Probanden ebenfalls detektiert wurde.

Während alle untersuchten Targetgene sowohl von Patienten als auch von gesunden Probanden transkribiert wurden, zeigte nur eines der untersuchten Gene einen Unterschied in seiner Regulation. Das Gen *DKK1* wird normalerweise von NANOG1 aktiviert. Es konnten Transkripte dieses Gens in der Mehrheit der Patienten mit t(4;11)-Translokation aber nicht in gesunden Probanden oder den Zelllinien (außer NTERA-2 und HEK-293T) nachgewiesen werden. In keinem der Patienten wurde eine NANOG1-Expression detektiert und trotzdem war dieses Targetgen transkriptionell aktiv. Eine mögliche Erklärung für die ausschließliche Transkription des Gens in Leukämiepatienten wäre, dass die Regulation dieses Gens konzentrationsabhängig ist und nur ab einer höheren NANOG1- oder NANOG2-Konzentration angeschaltet werden kann. Dieser Schwellenwert konnte vermutlich nur in den Zellen der Leukämiepatienten erreicht werden.

Allen Ergebnissen zufolge scheinen die NANOG1-Targetgene demnach nicht ausschließlich von NANOG1 reguliert zu werden.

Diese Beobachtung wird durch die Studie unterstützt, in der Genexpressionsprofile von 59 ES-Zelllinien miteinander verglichen wurden. Danach wurde nur eine geringe Korrelation z.B. zwischen NANOG1 und seinen Targetgenen *PAX6* und *NEUROD1* oder überhaupt keine Korrelation zwischen NANOG1 und *SOX2* festgestellt (Stem cell initiative, 2007). Eine von Boyer *et al.* beschriebene Interaktion zwischen NANOG1 und den Promotoren dieser Gene führt demnach nicht automatisch zu einer Regulation. Es ist daher wahrscheinlich, dass die NANOG1-Targetgene bei NANOG1-Expression nicht alle aktiviert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse der NANOG1 A exprimierenden HEK-293T-Zellen unterstütze diese Behauptung, denn von 12 untersuchten NANOG1-Targetgenen zeigten nur 3 Gene eine 2-fache Hochregulierung ihrer Transkription. Die anderen Gene wiesen nur eine geringe bzw. keine Veränderung auf. Eine Vielzahl der von NANOG1 regulierten Gene ist vermutlich nicht allein durch NANOG1 regulierbar und deshalb nicht für die Stammzellaufrechterhaltung entscheidend. Inwieweit die für die Stammzellaufrechterhaltung wichtigsten Gene durch NANOG2 reguliert werden, müsste in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, denn NANOG2 scheint nicht alle NANOG1-Targetgene zu regulieren, da Zelllinien mit nachweislicher NANOG2-Transkription nicht alle Gene gemäß dem erwarteten NANOG1-Expressionsprofil transkribierten.

Nichtsdestotrotz könnte das NANOG2-Protein eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters spielen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen identifizierten Gene, die sowohl von NANOG1 als auch von NANOG2 reguliert wurden. Eines der von beiden Proteinen regulierten Gene ist *DNMT3B*, welches für einen Stammzellfaktor kodiert. In dieser Arbeit wiesen Zellen mit ektopisch exprimierten NANOG1 A-, NANOG2 D- und NANOG2 E-Proteinen ein erhöhtes *DNMT3B*-Expressionslevel auf, was durch RT-PCR-Experimente verifiziert werden konnte. Das Gen wird normalerweise in ES-Zellen stark exprimiert und hat eine wichtige Rolle in der früheren Embryogenese (Sato *et al.*, 2003; Sperger *et al.*, 2003). In Tumorzellen wurde ebenfalls eine Hochregulierung des *DNMT3B*-Gens detektiert. Da bei der NANOG-Analyse oft nicht zwischen *NANOG1*- und *NANOG2*-Transkripten

unterschieden wurde, ist es nicht auszuschließen, dass *NANOG2* in den Tumorzellen exprimiert wird, welches die *DNMT3B*-Transkription reguliert. In der vorliegenden Arbeit konnten in Zelllinien NTERA-2, RS4;11, SEM und den Blutzellen der Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie *DNMT3B*-Transkripte detektiert werden, die in gesunden Probanden fehlten. In den gleichen Zellpopulationen war ebenfalls das *NANOG2*-Gen hochreguliert. Nur ein gesunder Proband zeigte eine schwache *DNMT3B*-Bande, der ebenfalls *NANOG2* schwach transkribierte. Die t(4;11)-Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie zeigten jedoch keine Korrelation zwischen *NANOG2* und *DNMT3B*, denn Patienten, die kein *NANOG2* transkribierten, enthielten auch *DNMT3B*-Transkripte. Dass in *NANOG*-exprimierten Zellen auch *DNMT3B* hochreguliert wird, ist nicht unwahrscheinlich, da in einer anderen Studie bereits eine Korrelation zwischen *NANOG1* und *DNMT3B* beschrieben wurde (stem cell initiative, 2007). Es konnte jedoch noch nie ein Zusammenhang zwischen *NANOG2* und *DNMT3B* gezeigt werden.

Ein weiteres sowohl von *NANOG1* als auch von *NANOG2* hochreguliertes Gen ist *FOS*. Dieser Tumor-fördernde Faktor bildet zusammen mit *JUN* ein Dimer, welches viele Gene reguliert, deren Produkte die Proliferation kontrollieren. In Tumorzellen liegt das Gen normalerweise hochreguliert vor (Arbuthnot *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 2001).

Das dritte von *NANOG2* und *NANOG1* gemeinsam regulierte Gen ist *EGR1*. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der sowohl die Proliferation als auch die Zellentwicklung kontrolliert. Eines der für die Leukämie entscheidenden Aspekte ist die p21-Hochregulierung durch *EGR1*. Der Zellzyklusinhibitor p21 hilft Tumorstammzellen ihren Stammzellcharakter durch Quieszenz aufrechtzuerhalten und könnte dadurch entscheidend an der Onkogenese beteiligt sein (Viale *et al.*, 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann somit ein neues Modell zur Aufrechterhaltung der Onkogenese in Leukämiezellen erstellt werden (siehe Abb. 4.1). Die t(4;11)-Translokation induziert transkriptionelle Prozesse am *NANOG2*-Gen, wodurch einige für die Stammzellentwicklung wichtigen Gene aktiviert werden können, wie z.B. *DNMT3B*. Die Zellen wären wie Stammzellen therapieresistent und fähig zur Migration. Weiterhin werden Proteine wie *FOS* aktiviert, wodurch die Zellproliferation induziert wird und die Zellen einer ununterbrochenen Zellteilung ausgesetzt werden. Diese Zellen würden unter

normalen Bedingungen in die Apoptose gehen, werden aber vermutlich durch die Expression von EGR1 daran gehindert, denn der Faktor induziert das p21-Protein, der das Überleben der Leukämiezellen ermöglicht.

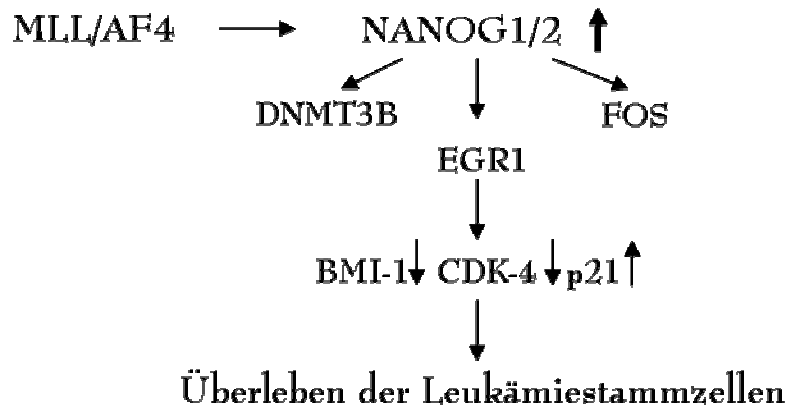


Abb. 4.1: Modell des in Leukämiezellen aktivierten Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Onkogenese.

Durch MLL/AF4-Translokation wird vermutlich NANOG2 hochreguliert, der die Gene DNMT3B, FOS und EGR1 ebenfalls hochreguliert. Der EGR1-Faktor kann das p21-Protein transkriptionell aktivieren, wodurch ein Überleben der Leukämiezellen ermöglicht wird, die auch Stammzeleigenschaften durch die Expression von NANOG2 oder DNMT3B besitzen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Substanzen	Bezugsquelle (Firma)
Acrylamid	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Alkalische Phosphatase	Invitrogen
Ammoniumbicarbonat	Roth
Ampicillin	Roth
APOD	Roth
Avidin	IBA BioTAGnology
Bacto Tryptone	Difco
Biotin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth/Bio Applied
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Kollodial	Sigma
DABCO	Roth
DAPI	Roth
Deoxycholat	Fluka
DMSO	Sigma
dNTPs	Peqlab
DTT	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure	Riedel-de Haen
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Roth
Glycerin 86%	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
Hering sperm DNA	Trevigen
Igepal	Sigma
IPTG	Saxon
Kaliumacetat	Roth
Kanamycin	Roth
Lithiumchlorid	Sigma
Magermilchpulver	Frema
Magnesiumchlorid	Roth

Magnesiumsulfat	Roth
Methanol	Sigma
Mowiol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
PMSF	Sigma
Polyethylenimin	Sigma
Prestained Protein Marker	New England Biolabs
Proteinase Inhibitor Mix	Amersham
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein G-Agarose	Sigma
Röntgenfixierlösung	Tetenal
Röntgen-Rapid-Entwickler	Tetenal
Saccharose	Roth
SDS	Biomol
TEMED	Sigma
Tris	Roth
TritonX-100	Sigma
Tween 20	Sigma
X-Gal	Roth
β-Mercaptoethanol	SERVA
λ-DNA für DNA-Marker	MBI Fermentas

Enzyme	Bezugsquelle (Firma)
RNase-free DNase	Qiagen
PCR Extended Polymerase	5 PRIME
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen (+ Puffer)	New England Biolabs
RNase	Sigma
RNasin	Promega
Superscript II + III TM Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Quickligase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Promega
Calf Intestinal Phosphatase	Invitrogen

Nährmedien + Zusatzstoffe	Bezugsquelle (Firma)
Collagen solution	Sigma
DMEM	PAA
FBS	Gold
G418	PAA
Goat serum	Sigma
Horse serum	PAA
L-Glutamin	PAA 10 x
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA 100 x
RPMI 1640	PAA
Sodium Pyruvate	PAA
Trypan Blau	Invitrogen
Trypsin-EDTA	PAA 10 x

Geräte	Bezugsquelle (Firma)
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Blotting-Apparatur für Western Blot	Fröbel
Digitalkamera	Hamamatsu
Durchflusszytometer CyFlow ML	PARTEC (FloMax® software)
Elektrophoresekammer	
- Agarosegele	B2, Owl Separation Systems
- SDS-PAGE	Whatman, Biometra
Fluoreszenzmikroskop	ZEISS
Gene Pulser™	Bio Rad
Gene Quant RNA/DNA-Calculator	Pharmacia
Luminometerplatte	Greiner
Mikroskop	Nikon
Neubauer-Zählkammer	Brand
PCR-Cycler	PE Applied Biosystems
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen	Greiner
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Greiner
- silikonisiert	Biozym
Reaktionsröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner
Rotationsschüttler	Infors
Säugerzell-Inkubator	Heraeus
SterilGard Hood (LaminAir HB2427)	Heraeus
Sonifier	Branson
Thermoschüttler	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414C/D	Eppendorf
UV-Schirm	Life Technologies
Vortex-2 Genie	Scientific Industries

Wasserbad	Julabo
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten	Sarstedt
Zellschaber	Greiner
Zentrifugen	
- J2-HS	Beckmann
- J6-HC	Beckmann

Sonstiges Material	Bezugsquelle (Firma)
3 mm Chromatographiepapier	Whatman
12 mm Deckgläser	Roth
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Dual-Glo TM Luciferase Assay System	Promega
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham
GeneRacer TM Kit	Invitrogen
Hybond TM -P	Amersham
PureYield TM Plasmid Midiprep System	Promega
Objektträger	Roth
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Röntgenfilme	Fujifilm
Amaza Kit	
Strep-Tactin Superflow	IBA BioTAGnology
Strep-Tactin Superflow Säule	IBA BioTAGnology
Vivaspin 500 µl Ausschlusssäulen	Sartorius Stedim Biotech

5.1.2 Pufferlösungen und Medien

Puffer	Zusammensetzung
2 x Lämmli-puffer	10 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM DTT 4 % SDS (w/v) 20 % Glycerin (w/v) 0,2 % Bromphenolblau (w/v)
TBE-Puffer	100 mM Tris 500 mM H ₃ BO ₃ 2,5 mM EDTA
2 x HBS	100 mM HEPES pH 7,05 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 281 mM NaCl

Puffer 1	50 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA
Puffer 2	1 % SDS (w/v) 0,2 M NaOH
Puffer 3	3 M KCH ₃ COO pH 4,8
SDS Puffer	100 mM NaCl 50 mM Tris pH 8,1 5 mM EDTA pH 8,0 0,5 % SDS (w/v) 1 mM PMSF
IP Puffer	100 mM NaCl 67 mM Tris pH 8,3 5 mM EDTA pH 8,0 1,7 % TritonX-100 (v/v) 0,3 % SDS (w/v)
WP1	150 mM NaCl 200 mM Tris pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 5,2 % Saccharose (w/v)
WP2	50mM HEPES pH 7,5 500 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % TritonX-100 (v/v) 0,1 % Deoxycholat (w/v)
WP3	250 mM LiCl 10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA 0,5 % Igepal (v/v) 0,5 % Deoxycholat (w/v)
Elutionspuffer	1% SDS, 0,1 M NaHCO ₃
TE Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA
PBS	70 mM Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O pH 7,4 30 mM KH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl

TBS	10 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
Anodenpuffer I	0,3 M Tris pH 10,4 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer II	25 mM Tris pH 10,4 20 % Methanol (v/v)
Kathodenpuffer	25 mM Tris 45 mM Capronsäure 20 % Methanol (v/v)
YT-Medium	1 % Bacto tryptone (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 0,5 % NaCl (w/v)
SOB-Medium	2 % Bacto tryptone (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v)
Salzlösung (E-Transformation)	1 M NaCl 100 mM MgCl ₂ 100 mM MgSO ₄
YT-Agar	1,2 % Agar (w/v)
YT _{amp} -Medium	100 µg/ml Ampicillin
YT _{kan} -Medium	25 µg/ml Kanamycin
Lysispuffer	150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7,5 0,4 mM EDTA 1 % TritonX-100 (v/v) 1 mM PMSF 0,4 % RNase (w/v)
YT _{x-Gal/IPTG} -Platte	0,02 mg IPTG 1,6 mg X-Gal
Strep-Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA

Strep-Elutionspuffer
100 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM oder 2 mM Biotin

5.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit für die Klonierungen, PCR-Analysen und Sequenzierungen Verwendung fanden, wurden gemäß den Vorschlägen des Experimentators erstellt und von den Firmen Operon und Biospring synthetisiert.

Primername	Sequenz
ATBF13*3	CTGCGTTCTGTGCAACTACTCC
ATBF16*5	CAGCGAAGCATGGGTTGCACC
ChIPN1/2-1*3	CGGGTACCATCTGCTCACTAAGTGTTAG
ChIPN1-1*5	CAGAAGCTTGTTAAAATGAGCTAACGGCT
ChIPN1-2*3	CAGGGTACCCGTGCCCAGCCGTTAG
ChIPN1/2-2*5	CAGAAGCTTCTTTGCATAAAAGCCTGAG
ChIPN1-3*3	CAGGGTACCATCCCATTCTCTGTTGA
ChIPN1/2-3*5	CAGAAGCTTCTGGATCCACACTCATGT
ChIPN2-1*5	CAGAAGCTTGTTAAAATGAGCTAACAATTTAG
ChIPN2-2*3	CAGGGTACCTCAACTCTACTAAATTGTTAG
ChIPN2-3*3	CAGGGTACCGTGCTGGAACCCAACTCT
Dach11*3	GACCTGTTCTGAAGCACTTGG
Dach12*5	GAATTATCCCAGGAGACATGAG
DKK11*3	CCTTGAAGTCTGGTTCTCAATTCC
DKK14*5	CCTGAGGCACAGTCTGATGACC
Dlx11*3	CCTACAGCTCAGCCTCGTCC
Dlx13*5	CTTGGATCGCTTGTTTTGGAACC
Dlx51*3	GACAGGAGTGTTTGACAGAAGG
Dlx52*5	GAGTCTTCTGAAACCTTCTCTG
DNMT3B*3	GAATTACTCACGCCCCAAGGAG
DNMT3B*5	GTACAGACAATAACCACCAAGTCG
E2_1*3	CACCCACACGAGATGG
En1*3	ACCCGGCTATCCTACTTATGG
En2*5	CCTGTGGCTTTCTTGATCTTGG
Esx112*3	GAGCTGAAGCAAGAGCAGGAGG
Esx114*5	GTGGCATAGGTGCTATGGGTGG
Fli2*3	AGTATGACCACATGAATGGATCC
Fli5*5	CACTCAATCGTGAGGATTGGTC
FoxA21*3	GACTGGAGCAGCTACTATGCAG
FoxA22*5	GATGAGCGAGATGTACGAGTAGG
FoxD3*3	GAGGACGTGGACATCGATGTGG
FoxD3*5	GAAGCAGTCGTTGAGTGAGAGG
GAPDH*3	CTTCCCATGGAGAAGG
GAPDH*5	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
GeneRacer5	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer5N	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
Hesx1*3	GTCTCCCAGCCTTCAGGAAGG

Hesx3*5	GTCTTCTCTAATATCGATACCAGG
hNanog*3	GCCTCCAGCAGATGCAAGAAC
hNanog*5	GCAGGAGAATTTGGCTGGAAC
hNanog_mRNA*3	ATTATAAATCTAGAGACTCC
hNanog_mRNA*5	TTGTTTGCCTTTGGGACTGGT
hox4*3	GAGCAATTTGCCAAGCTCCTGA
hox4*5	GCATAGTCGCTGCTTGATCGC
Hoxb11*3	GTTGACAGCTATGCAAGCGAGG
Hoxb12*5	GTTCTGTCAGCTGCCTTGTGG
Hoxb31*3	CCTACCAGTGCCACTAGCAAC
Hoxb32*5	CTCCTTCTCCAGCTCCACC
Hoxc41*3	GGATTCCAGCATCACCACCAGG
Hoxc42*5	GATCCTTCTCCTTCGGGTCAGG
hsox2*3	CCTGCTGCGAGTAGGACATG
hsox2*5	AGCGCTGCACATGAAGGAGC
IPCR*51	CTTAGATTTTCATTCTCTGGTTCTGGAAC
Isl12*3	GAGAGCTGTACATGCTTTGTTAGG
Isl15*5	GTCATTGGGCTGCTGCTGCTGG
Jarid26*3	CAATGGTTCCAGCAGGTCAAC
Jarid27*5	CTGAGATTGTGTGGTTGACAGC
luc12	CTAGCAAAAATAGGCTGTCC
Meis2*3	CTCCTCTGCACTCGCATCAG
Meis6*5	CTGGTCAGTTAGATTTGCTGATC
Myst32*3	CCATCTGTAGTTTCTGTCTTGG
Myst36*5	GTTGAACTTCAAGGAGACATTGC
Nanog1_BglII*3	gatcagatctAACATGAGTGTGGATCCAGCTTGTC
Nanog4_EcoRI*5	ggaattcTCACACGTCTTCAGGTTGCATGTTC
Nanog4_KpnI*5	gtcaggtaccaaCACGTCTTCAGGTTGCATGTTC
nanogiPCR5neu	CATCTCAGCAGAAGACATTTGCAAGG
nanog_KpnI*5neu	gtcaggtaccaaTCACACGTCTTCAGGTTGCATGTTC
Nanogp1R0	GTTGCTCCACATTGGAAGG
Nanogp1R1	CACCAGGCATCCCTG
Nanogp1R2	GCCACCTCTTAGATTTTCATTCTCTGGTTCTGG
Nanogp1UTR	CCTTCAGCAAAGAACAAGCTTC
Nanogp5*5	CTGGTGGTAGGAAGAGTAAAGG
Nanogp8*3	CAAAGCTTGCCTTGCTTTGAAGA
nanogSfiI_IBA*3	catggcctcactggccaaATGAGTGTGGATCCAGCTTGTC
nanogSfiI_IBA*5	catggccagtggaggccaaCACGTCTTCAGGTTGCATGTTC
nanog_XhoI*3	gatctcgcagAACATGAGTGTGGATCCAGCTTGTC
nE1_BamHI*3	ctggatccGACACAATGGGACAGGGAGC
nE3_BamHI*3	ctggatccATGAGTGTGGATCCAGCTTGTC
nE6_XhoI(2)*5	catcctcgagCACGTCTTCAGGTTGCATGTTC
Nfix1*3	GTTCCACCCGTTTCATCGAGG
Nfix4*5	GGTTGATGTTGTAGTAGCTGG
NR4A21*3	CTAGTTGCCAGATGCGCTTCGAC
NR4A23*5	CTGGATATGCTGGGTGTCATCTCC
Pax63*3	CAGGTATTACGAGACTGGCTCC
Pax65*5	CTGATGGAGTTGGTATTCTCTCC
pE1_BamHI*3	ctggatccGACGCAATGGGACAGGGAGC
Rest*3	GTGAGCGAGTATCACTGGAGG
Rest*5	GATACTGTAGATTACACTTCTTGG
Runx3*3	CAAGATGGGCGAGAACAGCGG
Runx6*5	TCCTCCAGCTTCTGCCGGTG
Skil2*3	CTGTTATAAAGCAGGAAGGTGACC
Skil5*5	CTGCTGTTCTTCAGTGAGTTCC
SLC2A14*3	GTAAATGTGGTTACAAAACGTGAC

Smarcad11*3	GCTGAAGAGGAGAATGCTGAAGG
Smarcad13*5	GTCTGAAGTTTAGCATCTTTAAGG
Sox4*3	CTCAAGCACATGGCTGACTACC
Sox4*5	GAACAGGTAGACGCGCTTCACC
Sox53*3	GTCTTGTCTAGTACAGCCCTGG
Sox55*5	GACGCTGTTTCTCAATCTGAGAGG
Stat32*3	GAGATTGACCAGCAGTATAGC
Stat35*5	GTCATCCTGGAGATTCTCTACC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Zic31*3	GAACAACCACGTCTGCTACTG
Zic33*5	GCTGGTGCTAGTTTGAAGTGC
Zfp36l11*3	CCACCATCTTCGACTTGAGC
Zfp36l12*5	CAGCTCCGTCTTGTACTTGG

5.1.4 Verwendete Organismen

Bakterienstamm	Genotyp
Dh5α-T1_R	<i>F-ϕ80/lacZΔM15Δ(lacZYa-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (confers resistance to phage T1)</i>
Top10	<i>mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80DlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 AraD139 D(ara, leu) 7697 ga/U ga/K, I- rspL (strepR) endA1 nupG</i>
JM110	<i>rpsL (smR), thr, leu, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]</i>

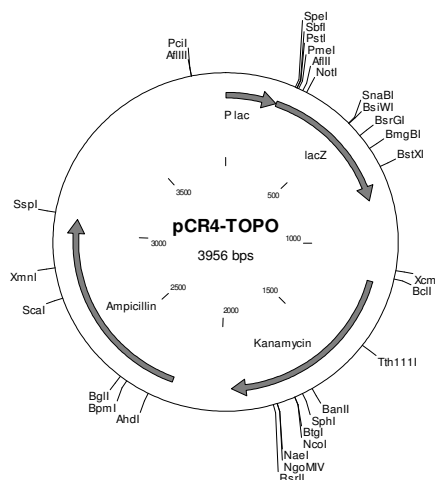
Zelllinie	Zelltyp	Referenzen
HEK-293wt	293 ist eine humane embryonale Nierenzelllinie mit beinahe triploidem Karyotyp und 6% Polyploidie; 69(64-69)XX?X, +1, +6, -10, -13, -16, -18, -20, +21, +22, +mar, add(?X)(p22), inv(1)(p35q43), del(1)(p35), i(5p), del(6)(q11), add(8)(q24), add(13)(p13), add(17)(qter), der(?)t(5;?)(q13;?)	Graham et al., 1977
HEK-293T	293T ist eine Derivatzelllinie von 293, die mit dem Adenovirus Typ5 transformiert wurde, der ein Temperatur-sensitives Gen für das SV40 T-Antigen trägt. Die Zellen weisen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Neomycin auf.	Graham et al., 1977
HeLa	Die Zelllinie wurde aus dem Gebärmutterkarzinom isoliert und später als Adenokarzinom diagnostiziert. Es enthält einen humanen hypertriploiden/hypotetraploiden Karyotyp mit 15% Polyploidie -82(77-84)<4n>XXX, -X, -2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7,	Gey et al., 1952 Scherer et al., 1953

	<p>-8, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22, +mar - der(1)t(1;3)(p11;q11), add(2)(q37), del(3)(q13), der(3)t(3;5)(q11;q11), i(5p)x4, del(6)(q15), der(9)t(1;9)(p11;p11), add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)x1-2, add(21)(p11), del(?22)(q12)</p>	
K562	<p>Die Zellen sind aus einer chronischen myeloischen Leukämie isoliert worden und enthalten das Philadelphia-Chromosom mit dem BCR-ABL b3-a2 Fusionsgen. Sie haben einen hypotriploiden Karyotyp 61-68<3n>XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3mar, del(9)(p11/13), der(14)t(14;?)(p11;?), der(17)t(17;?)(p11/13;?), der(?18)t(15;?18)(q21;?q12), del(X)(p22)</p>	Lozzio et al., 1973
Kopn-8	<p>Kopn-8 sind Vorläufer-B-Zellen aus einer humanen akuten lymphoblastischen Leukämie (BCP-ALL) des Typs BIII. Die Zellen tragen die Translokation t(11;19)(q23;p13), die das MLL-ENL Fusionsgen hervorbringt und haben einen hypodiploiden Karyotyp mit 4% Polyploidie -45(42-45)<2n>XX, -14, t(8;13)(q24;q21.2), der(13)t(13;14)(p11;q11)</p>	Nakazawa et al., 1978
Nalm-6	<p>Nalm-6 ist eine Vorläufer-B-Zelllinie isoliert aus dem peripheren Blut eines Patienten mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). Die Zellen haben einen beinahe diploiden Karyotyp - 46(43-47)<2n>XY, t(5;12)(q33.2;p13.2)</p>	Hurwitz et al., 1979
Nomo-1	<p>Nomo-1 sind Blutzellen aus dem Knochenmark eines Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie, die eine t(9;11)(q23;p22) MLL-AF9 Translokation tragen. Die Zellen haben einen hyperdiploiden Karyotyp mit 8% Polyploidie - 46-47<2n>XX, +8, -13, +mar, add(7)(q32), t(9;13)(q13;q11)</p>	Kato et al., 1986
NTERA-2	<p>NTERA-2 entwickelte sich aus der Zelllinie TERA-2, die aus dem humanen embryonalen Teratomkarzinom isoliert wurde. Die Zellen haben einen hyperdiploiden Karyotyp - 48-58<2n>XXXY, +1, +16, +20, +22, +3-4mar, add(X)(p11), add(X)(q2?5), der(X;1)(p10;q10), add(1)(p35-36), add(11)(p15), add(13)(q3?1)</p>	Fogh & Trempe 1975
RS4;11	<p>RS4;11 sind humane Vorläufer-B-Zellen aus einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL L2) mit einem hyperdiploiden Karyotyp - 47/48<2n>X/XX, +8, +18 und sie tragen das MLL-AF4 Fusionsgen t(4;11)(q21;q23)</p>	Stong et al., 1985
SEM	<p>SEM Zellen gehören ebenfalls zu einer Vorläufer-B-Zelllinie isoliert aus einer akuten lymphoblastischen Leukämie mit einer t(4;11)(q21;q23) Translokation. Die Zellen haben einen hypodiploiden Karyotyp mit 1.5% Polyploidie - 45(40-46)<2n>XX, -13, del(7)(p14)</p>	Greil et al., 1994

Die Suspensionzellen SEM, RS4;11, Nalm-6, K562, Kopn-8 und Nomo-1 wurden in dem Nährmedium RPMI 1640 geführt. Adhärente Zellen wie NTERA-2, HEK-293T/wt, HeLa wurden in dem DME Medium kultiviert. Mit Ausnahme der Medien für RS4;11 und NTERA-2 enthielten alle Medien 10 % FBS. Sowohl das Medium für die Kultur RS4;11 als auch für NTERA-2 wurde mit 20 % FBS versetzt, wobei das letztere noch zusätzlich 10 % horse serum enthielt. Das DMEM für HeLa-Zellen enthielt 5 g Glukose und zusätzlich 1 % Pyruvat. Alle Medien wurden mit 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt. Die Kultivierung selber erfolgte in Inkubatoren mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C Wärme. Alle Säugerzelllinien wurden bei 7,5 % (HEK-293T und HeLa bei 5 %) CO₂ gehalten.

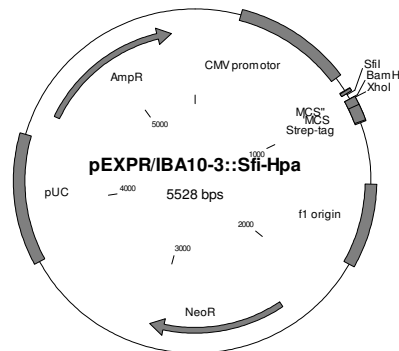
5.1.5 Für die Klonierung verwendete Vektoren

Name	Beschreibung
pCR [®] 4-TOPO [®]	Linearisierter bakterieller Klonierungsvektor mit Thymidin-Überhängen für die direkte Insertion der durch die <i>Taq</i> -Polymerase synthetisierten PCR-Amplimere. Es enthält die Bindestellen für das T7 Oligonukleotid, das für die Sequenzierung des klonierten Amplimers verwendet wird. Der Vektor enthält ein β -Galactosidase codierendes Gen, mit dessen Hilfe eine blau-weiß-Selektion ermöglicht wird. Durch die Insertion wird das Gen zerstört und die Klone bleiben weiß. (TOPO TA Cloning [®] Kit For Sequencing, Invitrogen)



**pEXPR-IBA10-3
::HpaI-SfiI (IBA)**

Ein eukaryontischer Expressionsvektor mit einem CMV Promotor vor der MCS, von der stromabwärts eine für einen Strep-Tag kodierende Sequenz liegt.



pEXPR-IBA::A

Die *NANOG1* (A)-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden nanogSfiI_IBA*3/nanogSfiI_IBA*5 aus der NTERA-2 gewonnenen cDNA amplifiziert und über die *SfiI*-Schnittstellen in den Vektor pEXPR-IBA10-3::HpaI-SfiI kloniert.

pEXPR-IBA::B

Zunächst wurde die in den pEXPR-IBA::A klonierte *NANOG1*-Sequenz mit den Oligonukleotiden nE3_BamHI*3 und nE6_XhoI(2)*5 vervielfältigt und über die *BamHI/XhoI* Schnittstellen in den Grundvektor pEXPR-IBA10-3::HpaI-SfiI ligiert. Die *NANOG1*-Sequenz, die die neuen Exons 1b und 2 enthält, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide nE1_BamHI*3 und IPCR*51 aus der NTERA-2 cDNA amplifiziert und über die *BamHI*-Schnittstelle in den Vektor kloniert.

pEXPR-IBA::D1

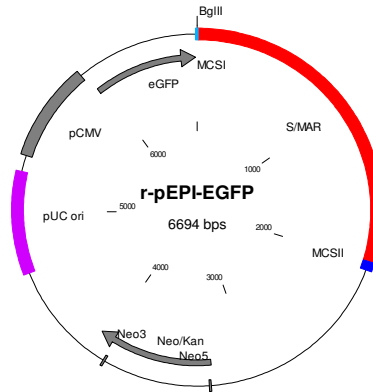
Die *NANOG2*-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden Nanog1_BglII*3 und nE6_XhoI(2)*5 aus der cDNA der SEM Zelllinie amplifiziert und in den Grundvektor über die Schnittstellen *BamHI/XhoI* kloniert.

pEXPR-IBA::D/E

Die zweite aus der SEM cDNA mit den Oligonukleotiden pE1_BamHI*3 und IPCR*51 amplifizierte *NANOG2*-Sequenz mit dem neuen Exon 1b wurde über die Schnittstellen *BamHI* (*BamHI/PpuM1* bei Variante E) in den Vektor pEXPR-IBA::D1 kloniert.

**pEPI-eGFP
(Clontech)**

Ein episomaler und embryonaler Expressions-Grundvektor für die Etablierung einer stabilen Zelllinie. Er enthält keinen Promotor, besitzt aber eine S/MAR-Domäne, über die der Vektor an den Chromosomen haften bleibt.

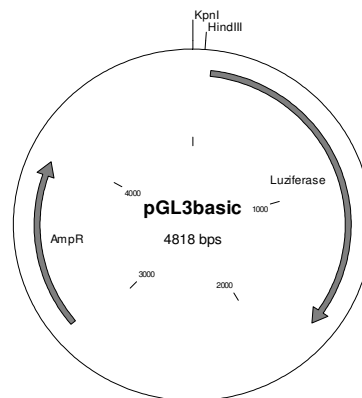


pEPI::A/B/D/E

Die in den Vektor pEXPR-IBA klonierte *NANOG1*- und *NANOG2*-Sequenzvarianten mit dem CMV-Promotor und der Strep-Tag-kodierenden Sequenz wurden durch den *Bgl*II- und *Bam*HI-Verdau in den episomalen pEPI-eGFP Grundvektor über die *Bgl*II-Schnittstelle kloniert.

**pGL3[®]-Basic
(Promega)**

Eukaryontischer Expressionsvektor mit einem promotorlosen Luziferase-Reportergen zur Untersuchung von DNA-Sequenzen auf Promotoraktivität. Das Luziferasegen kodiert für eine 61 kDa Firefly-Luziferase.



pGL3::ChIPN1-1	Die DNA-Sequenz vor Exon 1a von <i>NANOG1</i> wurde mittels der Oligonukleotide ChIPN1/2-1*3 und ChIPN1-1*5 aus humaner genomischer DNA vervielfältigt. Dieses Fragment wurde vor ein promotorloses Luziferasegen des pGL3-Basic-Grundvektors über <i>KpnI</i> und <i>HindIII</i> kloniert.
pGL3::ChIPN1-2	Die DNA-Sequenz zwischen Exon 1a und Exon 2 von <i>NANOG1</i> wurde mittels der Oligonukleotide ChIPN1-2*3 und ChIPN1/2-2*5 aus humaner genomischer DNA vervielfältigt und wie bei dem vorherigen Vektor vor ein promotorloses Luziferasegen des pGL3-Basic-Grundvektors über <i>KpnI</i> und <i>HindIII</i> kloniert.
pGL3::ChIPN1-3	Die DNA-Sequenz vor Exon 3 von <i>NANOG1</i> wurde mittels der Oligonukleotide ChIPN1-3*3 und ChIPN1/2-3*5 aus humaner genomischer DNA vervielfältigt und in den pGL3-Basic-Grundvektor über <i>KpnI</i> und <i>HindIII</i> ligiert.
pGL3::ChIPN2-1	Die DNA-Sequenz vor Exon 1a von <i>NANOG2</i> wurde mit den Oligonukleotiden ChIPN2-1*5 und ChIPN1/2-1*3 aus der genomischen DNA amplifiziert und in den Grundvektor pGL3-Basic in die Schnittstellen <i>KpnI</i> und <i>HindIII</i> kloniert.
pGL3::ChIPN2-2	Die DNA-Sequenz vor Exon 1b von <i>NANOG2</i> ist aus der genomischen DNA mit den Oligonukleotiden ChIPN2-2*3 und ChIPN1/2-2*5 vervielfältigt und in den pGL3-Basic Vektor ligiert worden.
pGL3::ChIPN2-2	Die DNA-Sequenz vor Exon 3 von <i>NANOG2</i> wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ChIPN2-3*3 und ChIPN1/2-3*5 vervielfältigt und in den pGL3-Basic-Grundvektor über die vorher erwähnten Schnittstellen kloniert.
pGL3::SV40 (renilla)	Dieser Vektor hat eine Luziferase-kodierende Sequenz, die vom SV40-Promotor kontrolliert wird. Es handelt sich in diesem Fall um eine Renilla-Luziferase, die ein anderes Produkt als die Firefly-Luziferase abbaut und ihre Aktivität wird unabhängig von der Firefly-Luziferase-Aktivität gemessen. Die Aktivität der Renilla-Luziferase dient dabei als eine interne Kontrolle, auf die die Aktivität der Firefly-Luziferase bezogen wird.

5.1.6 Verwendete Antikörper

Name	Beschreibung
Anti-Nanog H155	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen den C-Terminus des humanen NANOG-Proteins; Santa-Cruz Biotechnology
Anti-Nanog 2C11	monoklonaler Maus-Antikörper gegen den C-Terminus des humanen NANOG-Proteins; Abnova
Anti-Nanog ab21624	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den humanen N-Terminus von NANOG; Abcam
Anti-OCT4 sc-8629	polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen den N-Terminus von OCT4; Santa Cruz Biotechnology
Anti-SOX2 ab59776	polyklonaler Kaninchenantikörper, der den N-Terminus des SOX2 Proteins erkennt; Abcam
Anti-PolIII ab5408	monoklonaler muriner RNA Polymerase II Antikörper; erkennt eine C-terminale Sequenz der CTD-Domäne; erkennt sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der RNA Polymerase II; Abcam
Anti-H3K4 ab8580	polyklonaler anti-Histon H3 tri-Methyl-K4 Antikörper aus Kaninchen; Abcam
Anti-H3K9 ab8898	polyklonaler Anti-Histon H3 tri-Methyl K9 Antikörper aus Kaninchen; Abcam
Anti-IgG sc-2025	polyklonaler Anti-IgG Antikörper aus der Maus; Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ubiquitin sc-8017	monoklonaler anti-Ubiquitin Antikörper aus der Maus; Santa Cruz Biotechnology
Anti-Acetyllysine ab 21623	anti-Acetyl-Lysin Antikörper aus Kaninchen; Abcam
Anti-strep-Tactin HRP	Antikörper gegen den Strep-Tag, konjugiert mit horseradish peroxidase; IBA BioTAGnology
Anti-Phosphotyrosin 05-321	monoklonaler anti-Phosphotyrosin Antikörper aus der Maus; Upstate

Anti-SUMO AP1290a	ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, was mit dem SUMO-Protein in voller Länge immunisiert wurde; der Antikörper erkennt alle drei SUMO-Isoformen; Abgent
Anti-mouse	anti Maus IgG; Amersham
Anti-Rabbit	anti-Kaninchen IgG; Amersham
Anti-Rabbit-FITC 111-095-003	anti-Kaninchen IgG; produziert in der Ziege; Dianova

5.2 Standardmethoden

5.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die unten genannten Methoden sind den Protokollsammlungen entnommen (Sambrook *et al.*, 2001) oder wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sofern sie nicht anders ausgeführt worden sind, werden sie nicht detailliert vorgestellt.

- Minilysat-Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* nach der Methode der alkalischen Lyse
- Midi-Präparation der Plasmid-DNA aus *E.coli*
- Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Ligation der DNA mit T4 Ligase
- elektrophoretische Auftrennung der DNA und der Proteine
- Transformation von *E. coli* mit Hilfe von Calciumchlorid und Elektroporation
- Fällung der DNA für die Sequenzierung
- DNase-Verdau
- photometrische Vermessung der Nukleinsäuren
- Isolierung der RNA aus Säugerzellen
- Reverse Transkription mit reverser Transkriptase
- DNA-Aufreinigung aus dem Gel
- Zellzählung mit der Neubauerkammer und dem Zellsortierer

5.2.2 Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode. Sie ermöglicht eine auf den unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer. *Taq*-amplifizierte PCR-Amplimere, die sequenziert werden mussten, wurden zunächst in den Vektor pCR®4-TOPO ligiert. Wegen den Überhängen in dem Vektor konnte das Amplimer direkt ohne einen Restriktionsverdau in den Vektor eingebaut und mit Hilfe des Oligonukleotids T7 sequenziert werden. Aufgrund einer blau-weiß-Selektion konnten die positiven weißen Klone von den negativen blauen Klonen unterschieden werden.

5.2.3 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Die RNA wurde aus den Säugerzellen mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kit isoliert. Das Protokoll wurde leicht verändert, da nur die cytosolische RNA von Interesse war. Die Zellen wurden mit Hilfe des RLN-Puffers lysiert. Der im Protokoll beschriebene Lysisschritt mit Hilfe der Schreddersäulen wurde weggelassen. Die Zellen wurden in 175 µl RLN-Puffer gelöst und für 5 min im Eis inkubiert. Nach der Trennung der cytosolischen Fraktion vom festen Anteil mittels Zentrifugation für 2 min bei voller Leistung (4 °C) wurde die RNA wie im Protokoll beschrieben mit Hilfe des RLT-Puffers und des Ethanol gefällt und auf die rosa RNeasy Mini Spin Säule gegeben. Da zu den 175 µl RLN-Puffers zusätzlich 600 µl RLT und 430 µl 96 % Ethanol zugegeben wurden, musste die rosa Säule wegen ihres begrenzten Volumens zweimal befüllt werden. Weiter wurde nach dem Protokoll verfahren. Die RNA wurde dreimal in denselben 30 µl Wasser von den Säulen eluiert und vermessen. Vor der Transkription wurde die RNA auf gDNA-Kontamination in PCR-Reaktionen überprüft. Sofern die RNA nicht sauber war, wurde ein DNase-Verdau in Lösung oder ein Restriktionsverdau durchgeführt. Es wurden Restriktionsenzyme verwendet, die in den zu untersuchenden Sequenzen schneiden. Sowohl der DNase- als auch der Restriktionsverdau wurden eine Stunde lang bei

Raumtemperatur oder bei 37 °C (Restriktionsverdau) inkubiert und die RNA wurde erneut mittels des Qiagen Rneasy Mini Kits gereinigt.

Je 1 µg RNA wurde für die Reverse Transkription verwendet. Die hergestellte cDNA wurde in 50-100 µl Wasser aufgenommen und in PCR-Reaktionen überprüft.

5.3 PCR-Techniken

5.3.1 RT-PCR-Experimente

Für die unterschiedlichen RT-PCR-Reaktionen wurden 5 µl cDNA in einem 50 µl Reaktionsansatz verwendet. Dieser bestand aus *Taq*-DNA-Polymerase Reaktionspuffer, 0,2 µM des jeweiligen Oligonukleotids, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 1U *GoTaq* Polymerase. Alle PCR-Experimente wurden an den PCR-Geräten vom Typ GeneAmp PCR Systems 9700 durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde das gleiche Programm angewandt, das aus 26 Zyklen mit 30 sec langen Denaturierungsschritt bei 94 °C, einem 30 sec langen Primerhybridisierungsschritt von 65 °C bis 54 °C (-0,5 °C pro Zyklus) und einem 90 sec langen Elongationsschritt bei 72 °C bestand. Daraufhin folgten zusätzliche 14 Zyklen mit einem 30 sec langen Denaturierungsschritt, einem 30 sec langen Oligohybridisierungsschritt bei 54 °C und einem 90 sec langen Elongationsschritt. Die PCR-Reaktion wurde durch eine 5 min Elongation zum Schluß beendet.

5.3.2 PCR-Reaktionen

PCR-Reaktionen, die nicht mit dem vorher beschriebenen Programm durchgeführt worden sind, wurden mit einem zweiten Programm ausgeführt, bei dem nur die Primerhybridisierungstemperatur oder die Anzahl der Zyklen variierte. Das Programm war wie folgt: die DNA wurde zunächst 30 sec bei 94 °C denaturiert und nach dem anschließenden 30 sec langen Primerhybridisierungsschritt mit der unten angegebenen Annealingtemperatur mit einem 30 sec Elongationsschritt bei 72 °C beendet. Die Anzahl der Zyklen ist der unten abgebildeten Tabelle mit den dazugehörigen Oligonukleotidnamen zu entnehmen.

Oligonukleotidname	Hybridisierungs- temperatur (°C)	Zyklenzahl
ChIPN1/2-1*3 / ChIPN1-1*5	60	35
ChIPN1-2*3 / ChIPN1/2-2*5	60	35
ChIPN1-3*3 / ChIPN1/2-3*5	60	35
ChIPN1/2-1*3 / ChIPN2-1*5	60	35
ChIPN2-2*3 / ChIPN1/2-2*5	60	35
ChIPN2-2*3 / ChIPN1/2-3*5	60	35
E2_1*3 / NanogPCRneu*5	56	45
GAPDH*3 / GAPDH*5	58	35
hNanog*3 / hNanog*5	58	35
hNanog_mRNA*3 / hNanog_mRNA*5	45	45
Nanog1_BglII*3 / Nanog4_EcoRI*5	58	35
nanogSfiI_IBA*3 / nanogSfiI_IBA*5	58	35
nanogp5*5 / nanogp8*3	69	35

Tabelle 5.1: Oligonukleotide, ihre Hybridisierungstemperatur und ihre Zyklenzahl, die in dem oben beschriebenen PCR-Programm eingesetzt wurden.

5.3.3 RACE-Experiment

Alle 5'RACE-Experimente wurden mit dem Invitrogen RACE Kit entsprechend der Herstelleranleitung ausgeführt. 5 µg der aus den SEM- und NTERA-2-Zellen isolierten RNA wurde für den Dephosphorylierungs- und den anschließenden „decapping“-Schritt verwendet. Aufgrund der beschriebenen Vorgehensweise konnten die 5'-Phosphatreste der *bona fide* mRNA beibehalten werden. Diese Phosphatreste konnten für die Ligation eines 44 Nukleotid-langen RNA-Oligonukleotidmoleküls (Linker) genutzt werden. Die nun verbliebene RNA wurde mit Hilfe des Oligonukleotids Nanogp1R0 transkribiert, das spezifisch nur an die *NANOGL*- oder *NANOG*-Varianten mRNA bindet. Da an das 5' Ende der mRNA ein Oligonukleotid mit einer bekannten Sequenz ligiert wurde, konnte eine PCR mit NANOG- und Linker-spezifischen Oligonukleotiden (GeneRacer5 und Nanogp1R1) mit einem „touchdown“ PCR-Protokoll gemacht werden. In 10 anfänglichen Zyklen wurde die DNA zunächst 30 sec bei 94 °C denaturiert und in einem 3 min Schritt mit Oligonukleotiden hybridisiert und erweitert. Dabei nahm die Temperatur bei jedem Zyklus von 68 °C um 0,4 °C ab. Daraufhin wurden 25 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 30 sec bei 94 °C, einem Hybridisierungsschritt von 30

sec bei 64 °C und einem Elongationsschritt von 3 min bei 68 °C angehängt. Für die Signalverstärkung wurde eine nested PCR mit 35 Zyklen mit den Oligonukleotiden GeneRacer5nes und Nanogp1R2 durchgeführt. In jedem Zyklus wurde die DNA zunächst mit 94 °C für 30 sec denaturiert, in weiteren 30 sec mit Oligonukleotiden bei 64 °C hybridisiert und anschließend bei 68 °C und 90 sec verlängert. Die Produkte konnten mit einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert werden. Zur Bestimmung der Sequenz der gefundenen Transkripte wurden die Amplimere zunächst in den pCR®4-TOPO® Vektor ligiert und mit dem Oligonukleotid T7 sequenziert.

5.4 Transfektionstechniken

5.4.1 Lipotransfektion in HEK-293T-Zellen

Für die Proteinproduktion der unterschiedlichen *NANOG*-Varianten wurden die HEK-293T-Zellen mit den unterschiedlichen pEXPR-IBA-Vektoren lipotransfiziert. Die Klonierung der Vektoren wird in 5.1.3 detailliert beschrieben.

Für die Lipotransfektion wurden die Zellen in einer bestimmten Dichte, die der Tabelle 2.2 zu entnehmen ist, einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Eine Stunde vor der Lipotransfektion wurden die Zellen mit neuem Medium vorsichtig gespült und nach Ablauf der Zeit mit dem zwischenzeitlich vorbereiteten Mix behandelt.

Die Lipotransfektion erfolgte mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI), das in einem bestimmten Verhältnis zu der DNA und der Zellzahl eingesetzt wurde. Diese Substanz lag als eine sterile 100 mM Lösung vor. Sie wurde kurz vor der Transfektion zunächst gut gemischt, in Wasser zu einer 10 mM Lösung verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:6 mit kaltem PBS aufgestockt. Für jede Transfektion wurde ein bestimmtes Volumen dieses Gemisches (Lösung A) verwendet.

Die DNA wurde mit Hilfe des Midi Kits gereinigt, vermessen und in einem bestimmten Volumen PBS, das der Tabelle zu entnehmen ist, verdünnt (Lösung B). Während des Vortexens der Lösung A wurde die DNA im Abstand von etwa drei Sekunden zugetropft und anschließend 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Mix wurde auf die Zellen verteilt und die Zellen anschließend 36-48 h bei ihren normalen Bedingungen gehalten.

Zellzahl	Petrischalen- oberfläche (cm ²)	PEI/PBS (µl) Lösung A	DNA (µg)/PBS (µl) Lösung B
17,5 x 10 ⁶	506	1926	70/1605
7 x 10 ⁶	143	540	25/450
2,8 x 10 ⁶	57	216	20/180

Tabelle 5.2: Die bei der Lipotransfektion eingesetzte Zelldichte im Verhältnis zur PEI- und zur DNA-Konzentration.

5.4.2 CaPO₄-Transfektion in HEK-293wt-Zellen

17,5 x 10⁶ HEK-293wt-Zellen wurden am vorangegangenen Tag in einer 506 cm²-Zellkulturschalen ausgesät. Es wurden zwei Zellkulturschalen pro Vektorvariante verwendet. Unmittelbar vor der Transfektion wurde ein DNA-CaPO₄-Gemisch hergestellt. 70 µg DNA wurden in 4380 µl Wasser gelöst. In ein zweites Falcon wurden 5000 µl 2 x HBS vorgelegt. Kurz vor der Transfektion wurden 620 µl 2 M CaCl₂-Lösung zu dem DNA-Gemisch gegeben, kurz gemischt und zum 2 x HBS tröpfchenweise im Abstand von 3 sec zugegeben, während das 2 x HBS durch Vortexen aufgeschäumt wurde. Nach 20 min Inkubationszeit konnte die DNA zu den Zellen pipettiert werden, denen zuvor das Medium entzogen wurde. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde zu den Zellen das DME Medium zugesetzt, was mit 25 µM Chloroquin versetzt war. Nach 7 h wurde das alte Medium durch neues DME Medium ersetzt und die Zellen 48 h weiter wachsen lassen.

5.4.3 CaPO₄-Transfektion in HeLa-Zellen

Es wurden 4 x 10⁴ HeLa-Zellen pro Well in einer 24-Well-Zellkulturschale in 1 ml Medium ausgebracht und 24 h adhären lassen. Vor der Transfektion wurden zwei Lösungen hergestellt. Die eine Lösung enthielt 20 µg des zu überprüfenden Vektors mit dem putativen Promotor und 0,5 µg des pGL3::SV40 (renilla) Vektors gelöst in 450 µl Wasser (Lösung1). Lösung 2 enthielt 500 µl 2 x HBS. Kurz vor der Transfektion wurden 50 µl 2,5 M CaCl₂ zu der Lösung1 gegeben, diese wurde gut gemischt und unter Vortexen zur Lösung2 im Abstand von 3 sec zugetropft. Nach einer Minute

Inkubationszeit wurden pro Well 40 µl vom Gemisch gegeben. Es wurden Zellen aus drei Wells mit der gleichen DNA transfiziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden weitere 24 h wachsen lassen.

5.4.4 Lipotransfektion mit Amaxa-Kit in NTERA-2-Zellen

Die NTERA-2-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, dass am folgenden Tag die Zelldichte 70 % betrug. Für die Transfektion wurden 1×10^6 Zellen pro Transfektion in 100 µl Nukleofektor Kit L-Lösung vermengt und zu 10 µg pGL3-Basic oder eines der pGL3::ChIP-Vektoren zusammen mit 2 µg pGL3::SV40 (renilla) gegeben. Die Zellen wurden gleich daraufhin am Nukleofektor I (Amaxa) elektroporiert und in 500 µl RPMI 1640 Nährmedium aufgenommen. Nachdem die Zellen 5 min bei 37 °C inkubiert wurden, wurden sie zu 1 ml DME Medium gegeben, für weitere 5 h bei 37° C im Inkubator inkubiert und nach dieser Zeit wurde erneut das Medium gewechselt. Nach 24 h Inkubationszeit erfolgte die Luziferase-Messung.

5.5 Proteinaufreinigungsmethoden

5.5.1 Aufreinigung der NANOG-Proteinvarianten

Die Aufreinigung der NANOG-Proteine (Variante A, B, D und E) erfolgte mit Hilfe eines Strep-Tag-bindenden Systems. Bei diesem Verfahren wurde der an den C-terminalen Teil des NANOG1/2-Proteins angehängte Strep-Tag unter Anleitung des Herstellers an eine Matrix gebunden, von dieser eluiert und dadurch von anderen Zellbestandteilen isoliert, gereinigt und aufkonzentriert. Dazu wurden die mit unterschiedlichen *NANOG1/2*-Sequenzen lipotransfizierten HEK-293T-Zellen von fünf großen Zellkulturschalen (143 cm²) mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden eine Stunde bei 4 °C in 750 µl Lysispuffer rotiert. Nach der Abtrennung des festen Zellbestandteils von der löslichen Fraktion durch einen halbstündigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und voller Umdrehung wurde der Überstand auf 150 µl Strep-Tactin Superflow Material gegeben. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die gebundenen Proteine sechsmal mit 700 µl

Waschpuffer gewaschen und mit 80-100 µl Elutionspuffer (10 mM Biotin) nach 10 min Inkubationszeit abgelöst. In einem zweiten Elutionsschritt wurde das Material im 80 °C warmen 2 x Lämmli-puffer für 5 min inkubiert. 10 µl der bei jedem Schritt entstandenen Fraktionen wurden für eine immunologische Überprüfung entnommen.

5.5.2 Proteinaufreinigung für MALDI-MS

315 x 10⁶ HEK-293T-Zellen wurden auf 45 (143 cm²) große Zellkulturschalen ausgebracht und am darauffolgenden Tag mit pEXPR_IBA-Vektoren, die für die NANOG-Varianten A, D oder E kodieren, lipotransfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion abgeschabt, in PBS gewaschen, auf sechs 1,5 ml Eppendorf Gefäße verteilt und pelletiert. In jedes Gefäß wurden 830 µl Lysispuffer gegeben und die Zellen eine Stunde bei 4 °C durch ständiges Rotieren lysiert. Die lösliche Fraktion wurde durch einen Zentrifugationsschritt von 30 min bei 14000 g (4 °C) vom Zellpellet getrennt, mit 1 µl (10 µg/µl) Avidin versetzt und nach erneutem Rotieren für 15 min bei 4 °C wieder 20 min bei 14000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Lysispuffer auf 8 ml aufgefüllt und auf eine 0,2 ml Strep-Tactin Superflow Säule gegeben, die vorher mit 400 µl Waschpuffer äquilibriert wurde. Nach zweimaligem Durchlauf des ganzen Lysates wurde die Säule fünf Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde sechs Mal mit 100 µl Elutionspuffer (2 mM Biotin). Von jeder Fraktion wurden 10 µl Probe entnommen, im 12 % Gel getrennt und die erfolgreiche Proteinaufreinigung wurde im Western Blot überprüft. Der Rest wurde im 12 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbanden wurden aus dem Gel isoliert und nach der Dehydrierung mit Trypsin verdaut.

Gemessen wurde am Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus. Die als NANOG identifizierten Peptide wurden mit MALDI-MS/MS am Flex Analysis v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) prozessiert und mit Biotoools v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet.

5.6 Immunodetektion

5.6.1 Western Blot-Experiment

30 x 10⁶ SEM and 1 x 10⁶ NTERA Zellen wurden im oben genannten Lysispuffer lysiert. Zellüberstände und Zellpellet oder die aufgrund des Strep-Tags aufgereinigten Proteine wurden im 12 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf eine PVDF Membran mit einer Semidry-Apparatur transferiert. Die weiteren Schritte richteten sich nach dem verwendeten Antikörper und werden kurz für jeden Antikörper beschrieben.

Anti-NANOG ab21624, Anti-NANOG H155 und anti-NANOG 2C11

Die Membran wurde in 5 % Magermilchpulver und 0,1 % TritonX-100 in PBS (PBST) für 60 min blockiert. Die C-terminalen NANOG-Antikörper ab21624/H155 und der N-terminale Antikörper 2C11 wurden 1:1000 in der Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C hybridisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 5 min wurde die Membran mit dem entsprechenden zweiten Antikörper, der 1:10000 in der Blockierlösung verdünnt war, 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde erneut für 5 min dreimal mit PBST gewaschen und mit dem ECL Western Blotting Analysis System entwickelt. Der Röntgenfilm wurde 30 min bis 1 h auf den Blot aufgelegt.

Anti-Ubiquitin, anti-Acetyl-Lysin und anti-Phosphotyrosin

Entsprechend des ersten Antikörpers wurde die PVDF Membran in unterschiedlichen Blockierlösungen vor der Antikörperbehandlung inkubiert. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver und 3 % BSA bei Ubiquitin-Nachweis, in 3 % BSA für Acetyl-Lysin- und Phosphotyrosin-Nachweis blockiert. Der Ubiquitin-Antikörper und der Phosphotyrosin-Antikörper wurden 1: 2000 bzw. der Acetyl-Lysin-Antikörper 1: 1000 in der Blockierlösung verdünnt und über Nacht mit dem Blot inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit 0,1 % Tween-20 in TBS (TBST) konnte der zweite Antikörper auf die Membran gegeben und nach 1 h erneut dreimal mit TBST gewaschen werden. Der

Entwicklung mit dem ECL Western Blotting Analysis System folgte die Röntgenfilmentwicklung. Der Film wurde 10 min und 60 min auf den Blot aufgelegt.

5.6.2 Immunohistologisches Experiment

$1,3 \times 10^6$ HeLa Zellen wurden mit den pEXPR-IBA-Vektoren mit unterschiedlich kodierenden NANOG-Proteinvarianten (Variante A, B, D und E) lipotransfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen auf 12 mm große sterile Deckgläser, die vorher in 24well Petrischale deponiert wurden, ausgebracht und für zusätzliche 24 h wachsen lassen. Die Zellen wurden mit 100 % Methanol (-20 °C) für 20 min bei – 20 °C fixiert. Das Methanol wurde durch Verdampfen bei Raumtemperatur entfernt und die Zellen wurden mit PBS rehydriert, bevor sie mit der Blockierlösung (10% goat serum, 0,1 % TritonX-100 in PBS (PBST)) für 30 min behandelt wurden. Der C-terminale NANOG Antikörper (H155) wurde 1: 300 in PBST mit 1 % goat serum über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBST von den Zellen entfernt. Der zweite FITC-markierte anti-Kaninchen Antikörper wurde 1: 150 in PBST und 1 % goat serum verdünnt und für 1,5 h mit den Zellen hybridisiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBST gewaschen, mit 1 µg/ml DAPI 5 min inkubiert und nach einem einmaligen Waschschrift in DABCO/Mowiol eingebettet. Die Bilder wurden an einem Axio Observer Z1 mit der Digitalkamera CCD C4742-80-12AG erstellt und mit dem Programm Volocity bearbeitet.

5.6.3 Immunopräzipitationsexperiment

21×10^6 HEK-293T Zellen auf drei großen Zellkulturschalen (15 cm) wurden mit pEXPR-IBA-Vektoren mit unterschiedlich kodierenden NANOG-Varianten (Variante A, B, D und E) lipotransfiziert. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, mit PBS gewaschen und pelletiert. Es wurden drei Zellkulturschalen pro NANOG-Vektorvariante verwendet. Das Zellpellet wurde in 300 µl Lysispuffer 1 h durch ständiges Rotieren bei 4 °C lysiert und die lösliche wurde von der festen Fraktion durch einen halbstündigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und voller Umdrehungszahl getrennt. Zum Überstand wurden 50 µl Protein G Agarose gegeben und

30 min bei 4 °C rotieren lassen. Das Protein G wurde vor der Zugabe von 10 µl anti-SUMO durch eine 20 min lange Zentrifugation bei 14000 g entfernt. Die Inkubation des Zelllysates mit dem Antikörper erfolgte über Nacht bei ständigem Rotieren bei 4 °C. Erneut wurden 60 µl Protein G-Agarose zum Lysat-Antikörper-Mix gegeben und 4 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Protein-bindende Agarose wurde anschließend pelletiert (1 min, 200 g), sechsmal mit 700 µl kalten PBS gewaschen und das Protein mit 80 µl 2 x Lämmli-puffer von der Sepharose eluiert. Der Lämmli-puffer wurde vorher auf 80 °C erhitzt.

Von allen anfallenden Fraktionen wurde eine Probe entnommen, auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit anti-NANOG (H155) hybridisiert.

5.7 Etablierung einer stabilen Zelllinie

5.7.1 Etablierung der NANOG1/2 produzierenden HEK-293wt-Zelllinien

Zur Etablierung stabiler Zelllinien, die die NANOG-Varianten exprimieren sollten, wurden die HEK-293wt-Zellen mit den *NANOG1/2* kodierenden pEPI-Vektoren mittels CaPO_4 transfiziert. Jede Petrischale wurde nur mit einem Plasmid transfiziert, sodass im Endergebnis fünf unterschiedliche Zelllinien entstanden (untransfizierte Zellen, Mock-Kontrolle, die Variante A, B, D und E). Da der Grundvektor eine Neomycin-Resistenzkassette trägt, wurden die Zellen mit Neomycin selektioniert. 24 h nach der Transfektion wurden 0,4 mg/ml Neomycin zu den Zellen gegeben und jeden zweiten Tag mit dem Medium erneuert. Nach drei Wochen hörten die Zellen auf, sich abzulösen und wurden expandiert, wobei das Neomycin immer zugegeben wurde. Da nach einiger Zeit auch die Anzahl der Plasmid-losen Zellen zunahm, wurde die Neomycinkonzentration über mehrere Schritte auf 1,1 mg/ml erhöht. Die Zellen wurden 69 Tage kultiviert.

5.7.2 Verifizierung der *NANOG1/2*-Transkription

Die transfizierten Zellen ließen sich von den untransfizierten aufgrund des eGFP-Proteins, was vom pEPI-eGFP Plasmid kodiert wird, unterscheiden. Die Vermessung der Anzahl der transfizierten Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer CyFlowML. Für

die Messung wurden etwa 5×10^6 Zellen trypsiniert, in PBS gewaschen und in 500 μ l PBS gelöst.

Alle zwei Tage der Zellkultivierung wurden 2×10^6 Zellen in Stickstoff eingefroren. Diese Zellen wurden für die RNA-Isolierung aufgeschlossen und die RNA wurde in cDNA transkribiert. Sowohl die RNA als auch die cDNA wurden auf das Vorhandensein der unterschiedlichen *NANOG*-Varianten mit Hilfe der Oligonukleotide Nanogp1UTR und hnanog-mRNA*5 in einer RT-PCR überprüft.

Es wurden 5 μ g RNA aus Zellen, die noch die *NANOG*-mRNAs transkribierten, entnommen und in fünf einzelnen Ansätzen mit je 1 μ g RNA zu cDNA transkribiert. Die cDNA wurde von der Gruppe aus München (Dr. Kappler) in einem von ihnen etablierten PCR Microarray untersucht. Mit diesem Assay werden über 588 Gene auf ihre Expression quantitativ überprüft (Eichenmüller *et al.*, 2007). Von Interesse war die veränderte Genexpression in den Zellen, die mit den *NANOG*-kodierenden Vektoren transkribierten waren.

5.8 Promotoranalyse

5.8.1 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Das Chromatin der SEM-Zellen wurde zunächst mit 1 % Formaldehyd fixiert. Zu den 6×10^7 SEM-Zellen wurde das Formaldehyd ins Medium gegeben, gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Kreuzvernetzung zwischen der DNA und der auf ihr sitzenden Proteine wurde durch Zugabe von 0,1 M Glycin und 5 min Inkubationszeit gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit warmem PBS gewaschen, das Pellet in SDS Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten. Zwischenzeitlich wurden 400 μ l Protein A/G Sepharose mit 32 μ l Hering Sperma-DNA und 80 μ l 10 mg/ml BSA mit 688 μ l TE-Puffer zusammengegeben. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 4 °C und 800 rpm für 5 min wurde das Pellet in 4 ml IP-Puffer resuspendiert und 3 x 20 sec bei einer Amplitude von 30 % ultraschallbehandelt, um die genomische DNA in Fragmente zwischen 500-1000 bp zu zerkleinern. An dieser Stelle wurden 50 μ l Aliquot entnommen, um den Erfolg der Fragmentierung zu überprüfen. Zu diesem Volumen wurden 50 μ l Wasser und für den

Abbau der RNA 5 µl (10 µg/µl) RNase zugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mg/ml Proteinase K und die Inkubation für 30 min bei 65 °C. Etwa 10 µl der Probe wurden auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Bei guter Fragmentierung sollten die Chromatin-Trümmer als ein Schmier bei einer Größe von 200 bis 1000 bp zu sehen sein.

Falls die Fragmentierung erfolgreich war, wurde der restliche Zelllysat 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde mit 788 µl der vorbehandelten Protein- A/G Sepharose zusammengegeben bevor es für 4 h bei 4 °C rotieren konnte. Um die Sepharose von dem fragmentierten Chromatin erneut zu trennen, wurde es 1 min bei 1800 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand (etwa 500 µl) wurde auf 7 mit Silicon-behandelte 1,5 ml Reaktionsgefäße für die einzelnen Immunopräzipitationen verteilt und ein 10 µl Aliquot für spätere Untersuchungen entnommen. Die Immunopräzipitationen erfolgten rotierend über Nacht bei 4 °C mit folgenden Antikörpern: 2,5 µl Pol II, 5 µl αHiston H3-trimethyl K4/K9, 4 µl αSOX2, 2,5 µl αOct-3/4 C-20 und 10 µl αIgG.

Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Zugabe eines Antikörpers mitgeführt.

Nach der Bindung der Antikörper an das Chromatin wurden die überschüssigen Antikörper durch einen 20 min Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm zunächst entfernt. Zum Überstand wurden je 40 µl der vorbehandelten Protein A/G-Sepharose, die über Nacht ebenfalls rotierend inkubiert wurde, zugegeben und dieser wurde weitere 4,5 h bei 4 °C rotiert. Die Sepharose mit dem gebundenem Chromatin wurde durch eine Zentrifugation bei 4 °C für 1 min bei 800 g vom Rest getrennt und nach dreimaligem Waschen für 3 min mit Waschpuffer1, zweimaligem Waschen mit Waschpuffer2, 3 und einmaligem Waschen mit TE-Puffer wurde das Chromatin durch Inkubation mit 300 µl Elutionspuffer bei 65 °C über Nacht schüttelnd eluiert. Als eine Input-Kontrolle wurde das am Vortag genommene Aliquot ab diesem Schritt mitgeführt. Die Sepharose wurde nach dem Elutionsschritt für 1 min mit 6000g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und die Proteine am Chromatin wurden nach 90 min Inkubation mit 0,2 M NaCl durch die Proteinase K (0,2 mg/ml in 10 mM EDTA, 40 mM Tris/HCl, pH 8,0) 90 min bei 37 °C abgebaut. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem PCR Purification Kit. Die DNA wurde

in 100 µl sterilen Wasser eluiert und mit der PCR analysiert. Die dafür benötigten Oligonukleotide und das Programm sind unter Punkt 5.3.2 aufgeführt.

5.8.2 Luziferase-Experiment

Die mit pGL3-Basic, pGL3::ChIPN1-1, pGL3::ChIPN1-2, pGL3::ChIPN1-3, pGL3::ChIPN2-1, pGL3::ChIPN2-2, pGL3::ChIPN2-3 und pGL3::SV40 (renilla) transfizierten HeLa- und NTERA-2-Zellen wurden. 48 h nach der Transfektion mit DME Medium ohne Phenolrot gewaschen und anschließend in 100 µl des gleichen Mediums aufgefüllt. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurden 100 µl des ersten Lysis-Reaktionspuffers zugegeben, am Vortexer etwa 30 sec geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Der Überstand wurde in eine 96-Well- Luminometerplatte überführt und vermessen. 100 µl des zweiten Reaktionspuffers wurden zugegeben, weitere 10 min inkubiert und erneut gemessen. Dieser Versuch wurde in dreifacher Ausführung gemacht.

Die von der Firefly Luziferase erzeugte Aktivität wurde auf die Renilla Luziferaseaktivität bezogen, um einen von der Transfektionseffizienz unabhängigen Wert zu erhalten. Es wurde die folgende Formel verwendet:

$$RLU = LU \text{ (Luziferase Firefly/ Luciferase Renilla)} \times 100$$

Die einzelnen Werte wurden immer auf den RLU (relative light units)-Wert der Negativkontrolle (pGL3-Basic) bezogen, der gleich 100 % gesetzt wurde.

6 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AF4	ALL-1 fused gene on chromosome 4
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Rindenserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaPO ₄	Calciumphosphat
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
DABCO	1,4-Diaza- bicyclo(2,2,2)octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	embryonale Stammzellen
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyddehydrogenase
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
H ₃ BO ₃	Borsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
KCH ₃ COO	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LiCl	Lithiumchlorid

M	Molar
MCS	multiple cloning site
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
MLL	mixed lineage leukemia
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natronlauge
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
Na₂HPO₄	di-Natriumhydrogenphosphat
neo	Neomycin
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunden
Taq	<i>Therminus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

7 Literatur

- Al-Hajj M.** *et al.* (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3938-3988.
- Antequera A.** (2003). *Cell Mol. Life Sci* 60: 1647-1658.
- Arbuthnot P.,** Kew M., Fitschen W. (1991). *Anticancer Res.* 11: 921-924.
- Avilion A. A.,** Nicolis S. K., Pevny L. H., Perez L., Vivian N. and Lovell-Badge R. (2003). *Genes Dev.* 17: 126-140.
- Bellingham J.,** Tarttlin E. E., Foster R. G. and Wells D. J. (2003). *Jour. Exp. Zoo.* 297: 1-10.
- Bernstein B. E.,** Mikkelsen T. S., Xie X., Kamal M., Huebert D. J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S. L. and Lander E. S. (2006). *Cell* 125: 315-326.
- Bestor T.,** Laudano A., Mattaliano R. and Ingram V. (1988). *J. Mol. Biol.* 203: 971-983.
- Birke, M.,** S. Schreiner, M. P. Garcia-Cuellar, K. Mahr, F. Titgemeyer und R. K. Slany. (2002). *Nucleic Acids Res* 30 (4): 958-65.
- Blelloch R.,** Wang Z., Meissner A., Pollard S., Smith A. and Jaenisch R. (2006). *Stem Cells* 24: 2007-2013.
- Bonnet D. and Dick J. E.** (1997). *Nat. Med.* 3: 730-737.
- Booth H. A. F. and Holland W. H.** (2004). *Genomics* 84: 229-238.
- Boyer L. A.,** Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L. A., Lee T. L., Levine S. S., Wernig M., Tajonar A., Ray M. K., Bell G. W., Otte A. P., Vidal M., Gifford D. K., Young R. A. and Jaenische R. (2006). *Nature* 441 (7091): 349-353.
- Boyer L. A.,** Lee T. I., Cole M. F., Johnstone S. E., Levine S. S., Zucker J. P., Guenther M. G. Kumar R. M., Murray H. L., Jenner R. G., Gifford D. K., Melton D. A., Jaenisch R. and Young R. A. (2005). *Cell* 122 (6): 947-956.
- Chambers I.,** Colby D. and Robertson M. (2003). *Cell* 113:643-655.
- Chen L.,** Yang M., Dawes J and Khillan J. S. (2007). *Different.* 75(8): 682-693.
- Chiou S. H.,** Yu C. C., Huang C. Y., Lin S. C., Liu C. J., Tsai T. H., Chou S. H., Chien C. S., Ku H. H. and Lo J. F. (2008) *Clin. Canc. Res.* 14 (13). 4085-4095.
- Clark A. T.** (2007). *Stem Cell Rev.* 3: 49-59.

Daheron L., Opitz S. L., Zaehres H., Lensch W. M., Andrews P. W., Itskovitz-Eldor J. and Daley G. Q. (2004). *Stem Cell* 22: 770-778.

Darr H., Mayshar Y. and Benvenisty N. (2006). *Development* 133: 1193-1202.

Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E. and Reik W. (2001). *Proc Natl. Acad Sci USA* 98: 13734-38.

Deb-Rinker P., Ly D., Jezierski A., Sikorska M alnd Walker P. R. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 6257-6260.

Dick J. E. (2003). *Nature* 23: 231-233.

Dick J. E. (2005). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044: 1-5.

Do H. J., Lim H Y., Kim J. H., Song H., Chung H. M. and Kim J. H. (2007). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 353: 770-775.

Dou, Y., T. A. Milne, A. J. Tackett, E. R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka, C. D. Allis, B. T. Chait, J. L. Hess und R. G. Roeder. (2005). *Cell* 121 (6): 873-85.

El-Deiry W. S., Nelkin B. D., Celano P., Yen R. W., Falco J. P., Hamilton S. R. and Baylin S. B. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3470-3474.

Elliman S. J. Wu I. and Kemp D. M. (2006). *Jo. Bio. Chem.* 281: 16-19.

Ernst, P., J. Wang, M. Huang, R. H. Goodman und S. J. Korsmeyer. (2001). *Mol Cell Biol* 21 (7): 2249-58.

Ernst, P., J. K. Fisher, W. Avery, S. Wade, D. Foy und S. J. Korsmeyer. (2004). *Dev Cell* 6 (3): 437-43.

Ezeh U. I., Turek P. J., Reijo R. A. *et al.* (2005). *Cancer* 104: 2255-2265.

Felix C. A., Hosler M. R., Winick N. J., Masterson M., Wilson A. E. and Lange B. J. (1995). *Blood* 85: 3250-3256.

Caslini, C., A. Serna, V. Rossi, M. Introna und A. Biondi. (2004). *Leukemia* 18 (6): 1064-71.

Gaunt, S. J. and L. Strachan. (1994). *Dev Dyn* 199 (3): 229-40.

Gaussmann A., Wenger T., Eberle I., Bursen A., Bracharz S., Herr I., Dingermann T. and Marschalek R. (2007). *Oncogene* 26: 3352-3363.

Goncalves I., Duret L. and Mouchiroud D. (2000). *Genome Res.* 10 (5): 672-678.

- Gonzalez-Zuleta M.**, Bender C. M., Yang A. S. Nguyen T., Beart R. W. *et al.* (1995). *Cancer Res.* 55: 4531-35.
- Gu Y.**, Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G., Croce C. M. and Canaani E. (1992). *Cell* 71: 701-708.
- Gu P.**, LeMenuet D., Chung A. C. K., Mancini M., Wheeler D. A. and Cooney A. J. (2008). *Mol. Cel. Biol.* 25 (19): 8507-8519.
- Hajkova P. et al.** (2002). *Mech. Dev.* 117: 15-23.
- Hart A. H.**, Hartley L., Ibrahim M. and Robb L. (2004). *Dev. Dyn.* 230: 187-198.
- Hatano S. Y.**, Tada M., Kimura H., Yamaguchi S., Kono T., Nakano T., Suemori H., Nakatsuji N. and Tada T. (2005). *Mech. Dev.* 122: 67-79.
- Herman J. G.**, Jen J., Merio A., Baylin S. B. (1996). *Cancer Res.* 56: 722-27.
- Hess, J. L.**, B. D. Yu, B. Li, R. Hanson und S. J. Korsmeyer. (1997). *Blood* 90 (5): 1799-806.
- Hirotsune S.**, Yoshida N., Chen Am., Garrett L., Sugiyama F., Takahashi S., Yagami K. I., Wynshaw-Boris A. and Yoshiki A. (2003). *Nature* 423: 91-96.
- Hoelzer D.** (1997). *N. Eng. J. Med.* 336 (25): 1822-1824.
- Hoffbrand A. V. et al.** (1993). *Semin. Hematol.* 30 (4): 306-317.
- Holmes R. and Soloway P. D.** (2006). *Cytogenet. Gen. Res.* 113: 122-129.
- Hope K. J.**, Jin L. and Dick J. E. (2004). *Nat. Immunol.* 5: 738-743.
- Humphrey R. K.**, Beattie G. M., Lopez A. D., Bucay N., King C. C., Firpo M. T., Rose-John S. and Hayek A. (2004). *Stem Cells* 22: 522-530.
- Hyslop L.**, Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachan T. and Lako M. (2005). *Stem Cells* 23: 1035-1043.
- Feinberg A. P.**, Gehrke C. W., Kuo K. C. and Ehrlich M. (1988). *Cancer Res.* 48: 1159-1161.
- Freberg C. T.**, Dahl J. A., Timoskainen S. and Collas P. (2007). *Mol. Biol. Cell.* 18: 1543-1553.
- Isnard, P.**, N. Core, P. Naquet und M. Djabali. (2000). *Blood* 96 (2): 705-10.

- Isaacs, A. M.**, P. L. Oliver, E. L. Jones, A. Jeans, A. Potter, B. H. Hovik, P. M. Nolan, L. Vizor, P. Glenister, A. K. Simon, I. C. Gray, N. K. Spurr, S. D. Brown, A. J. Hunter und K. E. Davies. (2003). *J Neurosci* 23 (5): 1631-7.
- Ivanova N. B.**, Dimos J. T., Schaniel C., Hackney J. A., Moore K. A. and Lemischka I. R. (2002). *Science* 298: 601-604.
- Jauch R.**, Ng C. K., Saikatendu K. S., Stevens R. C. and Kolatkar P. R. (2007). *J. Mol. Biol.* 376 (3): 758-770.
- Johansson, B.**, A. V. Moorman, O. A. Haas, A. E. Watmore, K. L. Cheung, S. Swanton und L. M. Secker-Walker. (1998). *Leukemia* 12 (5): 779-87.
- Jurgens B.**, Schmitz-Drager B. J. and Schulz W. A. (1996). *Cancer Res.* 56: 5698-5703.
- Kautiainen T. L. and Jones P. A.** (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 1594-1598.
- Kennedy J. A.**, Barabe F., Pepl A. G. Wang J. C. Y. and Dick J. E. (2007). *Science* 318: 337.
- Kim J. S.**, Kim J., Kim B. S., Chung H. Y. Lee Y. Y. Park C. S., Lee Y. S., Lee Y. H. and Chung I. Y. (2005). *Exp. Mol. Med.* 37 (6): 601-607.
- Korneev S. A.**, Park J. H. and O'Shea M. (1999). *Jour. Neuro.* 19 (18): 7711-7722.
- Koziol M. J.** Garrett N. and Gurdon J. B. (2007). *Current Biol.* 17: 801-807.
- Krause D. S.** Theise N. D. Collector M. I. et al., (2001). *Cell* 105: 369.
- Kuroda T.**, Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S. Y., Suemori H., Nakatsuji N. and Tada T. (2005). *Mol. Cell. Biol.* 25: 2475-2485.
- Laird and Jaenisch** (1996). *Annu. Rev. Genet.* 30: 441-464.
- Lee T. I.**, Jenner R. G., Boyer L. A., Guenther M. G., Levine S. S., Kumar R. M., Chevalier B., Johnstone S. E., Cole M. G., Isono K., Koseki H., Fuchikami T., Abe K., Murray H. L., ucker J. P., Yuan B., Bell G. W., Herbolzheimer E., Hannett N. M., Su K., Odom D. T., Otte A. P., Volkert T. L., Bartel D. P., Melton D. A., Gifford D. K., Jaenisch R. and Young R. A. (2006). *Cell* 125: 303-313.
- Le Viseur C.**, Hotfilder M., Bomken S., Wilson K, Röttgers L., Schrauder A., Rosemann A., Irving J., Stam. R. W., Shultz L. D. Harbott J., Jürgens H., Schrappe M., Pieters R. and Vormoor J. (2008). *Cancer Cell* 14 (1): 47-58.
- Levasseur D. N.**, Wang J., Dorschner M. O., Stamatoyannopoulos J. A. and Orkin S. H. (2008). *Genes & Devel.* 22 (5): 575-580.

Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S. J., Murphy M. E., Appella E. and Xu Y. (2005). *Nat. Cell Biol.* 7: 165-171.

Loh Y. H., Wu Q., Chew J. L., Vega V. B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K. Y., Sung K. W., Lee C. W., Zhao X. D., Chiu K. P., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wei C. L., Ruan Y., Lim B. and Ng H. H. (2006). *Nat. Genet.* 38: 431-440.

Loh Y. H., Zhang W., Chen X., George J. and Ng H. H. (2007). *Genes Dev.* 21: 2545-2557.

Ma, C. and L. M. Staudt (1996). *Blood* 87 (2): 734-45.

Marfella C. G., Ohkawa Y., Coles A. H. Garlick D. S. Jones S. N. and Imbalzano A. N. (2006). *J. Cel. Physiol.* 209: 162-171.

Marschalek, R., I. Nilson, K. Lochner, R. Greim, G. Siegler, J. Greil, J. D. Beck und G. H. Fey. (1997). *Leuk Lymphoma* 27 (5-6): 417-28.

Martin G. R. (1981), *Proc. Natl. Acad.Sci USA* 78: 7634-7638.

Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K, Maruyama M., Maeda M. and Ymanaka S. (2003). *Cell* 113:631-642.

Monk M. and McLaren A. (1981). *J. Ebmryo. Exp. Morphol.* 63: 75-84.

Monk M. and Holding C. (2001). *Oncogene* 20: 8085-8091.

Mulero-Navarro S. and Esteller M. (2008). *Epigenetics* 3: 210-215.

Mullen E. M., Gu P. and Cooney A. J. (2007). *PPAR Res.* 2007:62563.

Mullin N. P., Yates A., Rowe A. J., Nijmeijer B., Colby D., Barlow P. N., Walkinshaw M. D. and Chambers I. (2008). *Biochem J.* 411 (2): 22-31.

Nakamura, T., T. Mori, S. Tada, W. Krajewski, T. Rozovskaia, R. Wassell, G. Dubois, A. Mazo, C. M. Croce und E. Canaani. (2002). *Mol Cell* 10 (5): 1119-28.

Nilson, I., M. Reichel, M. G. Ennas, R. Greim, C. Knorr, G. Siegler, J. Greil, G. H. Fey und R. Marschalek. (1997). *Br J Haematol* 98 (1): 157-69.

Niwa H., Burdon T., Chambers I. and Smith A. (1998) *Genes Dev.* 12: 2048-2060.

Niwa H., Miyazaki J. and Smith A. G. (2000). *Nat. Genet.* 24: 372-376.

Oh J. H., Do H. J., Yang H. M., Moon S. Y., Cha K. Y., Chung H. M. and Kim J. H. (2005). *Exp. Mol. Med.* 37: 250-254.

Orkin S. H., Wang J., Kim J., Chu J., Rao S., Theunissen T. W., Shen X., Levasseur D. N. (2008) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* Nov 6. Epub ahead of print.

Osawa M., Hanada K., Hamada H. and Nakauchi H. (1996). *Science* 273: 242-245.

Pain D., Chirn G. W., Strassel C. and Kemp D. M. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 6265-6268.

Pan G., Li J., Zhou Y., Zheng H. and Pei D. (2006). *FASEB J.* 20: 1730-1732.

Pan G and Pei D. (2005). *J. Biol. Chem.* 280 (2): 1401-1407.

Pereira L., Yi F. and Merrill B. J. (2006). *Mol. Cell. Biol.* 26 (20): 7479-7491.

Pochampally R. R., Smith J. R., Ylostalo J. and Prockop D. J. (2004). *Blood* 103: 1647-1652.

Pottier N., Yang W., Assem M., Panetta J. C. Pei D., Paugh S. W., Cheng C., Den Boer M. L., Relling M. V. Pieters R., Evans W. E. and Cheok M. H. (2008). *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (24): 1792-1803.

Prasad, R., T. Yano, C. Sorio, T. Nakamura, R. Rallapalli, Y. Gu, D. Leshkowitz, C. M. Croce und E. Canaani. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26): 12160-4.

Rabbits T. H. (1994). *Nature* 372: 143-149.

Rabbits T. H. (1999). *J. Pathol.* 187: 39-42.

Ramalho-Santo M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R.C. and Melton D. A. (2002). *Science* 298: 597-600.

Reik W., Dean W. and Walter J. (2001). *Science* 293: 1089-1093.

Rieger M. A. and Schroeder T. (2003). *Biospektrum* 254-256.

Ringrose L. and Paro R. (2004). *Annu. Rev. Genet.* 38: 413-443.

Robertson M., Stenhouse F., Colby D., Marland J. R. K., Nichols J., Tweedie S. and Chambers I. (2005): *Mamm. Genome* 17: 732-743.

Rodewald H. R. and Friedrich W. (2002). *Springer-Verlag* 45: 85-91.

Rodda D. J., Chew J., Lim L. H., Loh Y. H., Wang B., Ng H. H. and Robson P. (2005). *J. Biol. Chem.* 280: 24731-24737.

Sakai Y., Suetake I, Chinozaki F. Yamashina S., Tajima S. (2004). *Gene Expr. Patterns* 5: 231-237.

Sarg B., Helliger W., Talasz H., Koutzamani E., Lindner H. H. (2004). *J Biol Chem.* 279(51):53458-53464.

Sato N., Sanjuan I. M., Heke M., Uchida M., Naef F. and Brivanlou A. H. (2003). *Dev. Biol.* 260: 404-413.

Scholer H. R., Balling R., Hatzopoulos A.K., Suzuki N. and Gruss P. (1989). *EMBO J.* 8: 2551-2557

Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman M., Cusimano M. D. and Dirks P. B. (2004). *Nature* 432: 396-401.

Smith A.G., Nichols J., Robertson M. and Rathjen P.D. (1992). *Dev. Biol.* 151: 339-351.

Somervaille T. C. P., Matheny C. J., Spencer G. J., Iwasaki M., Rinn J. L., Witten D. M., Chang H. Y., Shurtleff S. A., Downing J. R. and Cleary M. L. (2009). *Cell Stem Cell* 4: 129-140.

Sperger J. M., Chen X., Draper J. S., Antosiewicz J. E., Chon C. H., Jones S. B., Brooks J. D., Andrews P. W., Brown P. O. and Thomson J. A. (2003). *PNAS* 100 (23): 13350-13355.

Stem cell initiative (2007). *Nat. Biotechnol.* (2007). 25 (7): 803-816.

Sumi T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. and Suemori H. (2007) *Oncogene* 26: 5564-5576.

Sutton J., Costa R., Lug M., Field L., Xu D., Largaespada D. A., Fletcher C. F., Jenkins N. A., Copeland N. G., Klemsz M. and Hromas R. (1996). *J. Biol. Chem.* 271:23126-23133.

Suo G., Han J., Wang X., Zhang J., Zhao Y., Zhao Y. and Dai J. (2005). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 337: 1047-1051.

Suzuki A., Ray A. and Kawakami Y. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10294-10299.

Szabo P. E., Hubner K., Scholer H. and Mann J. R. (2002). *Mech. Dev.* 115: 157-160.

Taki, T., H. Kano, M. Taniwaki, M. Sako, M. Yanagisawa und Y. Hayashi. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (25): 14535-40.

- Tanaka Y.**, Era T., Nishikawa S. I. and Kawamata S. (2007) *Blood* 110 (1): 107-115.
- Tschiersch, B.**, A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge und G. Reuter. (1994). *Embo J* 13 (16): 3822-31.
- Tuynder M.**, Susini L., Prieur S., Besse S., Fiussi G., Amson R. and Telerman A. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23: 14976-14981.
- van Echten J.**, Sleijfer D. T., Wiersema J., Schraffordt K. H., Oosterhuis J. W. and de Jong B. (1997). *Cancer Gen. Cytogen.* 96: 1-6.
- van Lohuizen, M.** (1999). *Curr Opin Genet Dev* 9 (3): 355-61.
- Viale A.**, De Franco F., Orleth A., Cambiaghi V., Giuliani V., Bossi D., Ronchini C., Ronzoni S., Muradore I., Monestiroli S., Gobbi A., Alcalay M., Minucci S. and Pelicci P. G. (2009). *Nature* 457: 51-57.
- Wang J. C. Y. and Dick J. E.** (2005). *Trends Cell Biol.* 15 (9): 494-501.
- Wang J.**, Rao S., Chu J., Shen X., Levassuer D. N., Theunissen T. W. and Orkin S. H. (2006). *Nature* 444: 364-368.
- Williams R. L.**, Hilton D. J. Pease S., Willson T. A., Stewart C. L. et al., (1988). *Nature* 336: 684-687.
- Wong D. J.**, Liu H., Ridky T. W. Cassarino D., Segal E. and Chang H. Y. (2008). *Cell Stem Cell* 2 (4): 333-344.
- Wu Q.**, Chen X., Zhang J., Loh Y. H., Low T. Y., Zhang W., Zhang W., Sze S. K., Lim B. and Ng H. H. (2006). *J. Biol. Chem.* 281 (34): 24090-24094.
- Yates Y. and Chambers I.** (2005). *Biochem. Soc. Trans.* 33 (6): 1518-1521.
- Yokoyama, A.**, I. Kitabayashi, P. M. Ayton, M. L. Cleary und M. Ohki. (2002). *Blood* 100 (10): 3710-8.
- Yu, B. D.**, J. L. Hess, S. E. Horning, G. A. Brown und S. J. Korsmeyer. (1995). *Nature* 378 (6556): 505-8.
- Yu J.**, Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007). *Science* 318 (5858): 1917-1920.
- Yuen M. F.**, Wu P. C., Lai V. C., Lau J. Y., Lai C. L (2001). *Cancer* 91: 106-112.

Zangrossi S., Marabese M., Broggin M., Giordano R., D'Erasmo M., Montelatici E., Intini D., Neri A., Pesce M., Rebull P. and Lazzari L. (2007). *Stem Cells* 25 (7): 1675-1680.

Zeisig, D. T., C. B. Bittner, B. B. Zeisig, M. P. Garcia-Cuellar, J. L. Hess und R. K. Slany. (2005). *Oncogene* 24 (35): 5525-32.

Zeleznik-Le, N. J., A. M. Harden und J. D. Rowley. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22): 10610-4.

Zhang J., Wang X., Li M. Han J., Chen B., Wang B. and Dai J. (2006). *FEBS J.* 273: 1723-1730.

Zhong X. and Jin Y. (2009). *J. Biol. Chem.* 284 (14): 9168-9175.

Ziemin-van der Poel S., McCabe N. R., Gill H. J., Espinosa R., Patel Y. Harden A., Rubinelli P., Smith S. D., LeBeau M. M., Rowley J. D. *et al.* (1991). *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 88: 10735-10739.

8 Anhang

Tabelle 8.1: Durch MALDI identifizierte Peptide der NANOG1/2-Proteine

NANOG1 A: (Sequenzabdeckung: 29,1%)

Sequenz:

TWFQNQR
TVFSSTQLCVLNDNR
GGGSGGGSGGGSWHPQFEK
TVFSSTQLCVLNDRFQR
YLSLQQMQELSNILNLSYK
YLSLQQMQELSNILNLSYK
QKYLSLQQMQELSNILNLSYK
TWFQNQRMKSKRWQKNNWPK
LVNGSLEVDLQGDHGLSAWHPQFEK

NANOG1 D: (Sequenzabdeckung: 13,5%)

Sequenz:

QKYLSLQQMQELSNILNLSYK
TWFQNQR
GGGSGGGSGGGSWHPQFEK

NANOG1 E: (Sequenzabdeckung: 13,8%)

Sequenz:

TWFQNQR
GGGSGGGSGGGSWHPQFEK
TVFSSTQLCVLNDRFQR

Tabelle 8.2: Genexpressionsprofile der NANOG1/2-exprimierenden HEK-293wt-Zellen

Genname	293wt	NANOG1 A	NANOG1 B	NANOG2 D	NANOG2 E
ACTL61	0,69	1,33	0,68	1,03	1,28
ACTR6	0,58	1,00	0,50	0,68	0,83
AOF2	0,89	1,56	0,93	1,11	1,38
ARID1A	0,5	1,08	0,7	0,69	1
ARID1B	1,12	2,03	1,93	0,83	1,28
ASH2L	0,5	0,93	0,72	0,76	0,86
ATRX	0,52	0,89	0,59	0,6	0,86
BAZ1A	0,74	0,98	0,96	0,86	0,91
BAZ1B	0,6	1,05	0,38	0,41	0,48
BAZ2A	0,74	1,25	0,61	0,94	1,04
BAZ2B	0,29	0,55	0,4	0,44	0,48
BPTF	0,59	1,29	0,7	0,87	0,81
BRD8	0,65	1,44	0,98	0,98	1,3
BTAF1	0,84	1,62	0,85	1,02	1,03
CARM1	0,81	1,42	0,76	1,04	1,05
CECR2	0,63	1,77	1,03	1,43	1,81
CHAF1A	0,55	1,33	0,62	0,78	0,96
CHAF1B	0,77	1,43	0,79	0,81	1,14
CHD1	0,58	1,46	0,89	1,00	1,00
CHD1L	0,68	1,26	0,76	1,01	0,84
CHD2	0,38	2,01	0,73	0,84	0,73
CHD3	0,61	1,25	0,87	0,87	0,84
CHD4	0,59	1,22	0,86	0,9	1,05
CHD5	0,29	2,24	1,08	1,24	0,96
CHD6	0,51	0,83	0,71	0,89	1,09
CHD7	1,06	1,66	0,99	1,17	1,52
CHD8	1,00	1,47	0,7	0,82	0,96
CHD9	0,73	1,53	0,87	1,11	1,36
DMAP1	0,53	1,05	0,69	0,73	0,87
DNMT1	0,82	1,6	0,86	1,05	1,21
DNMT3A	0,69	1,26	0,81	1,05	1,20
DNMT3B	1,05	1,71	0,94	1,44	1,46
EB400	0,94	1,52	1,00	1,02	1,48
EPC1	0,87	1,59	0,85	1,08	1,23
ERCC6	1,09	2,32	1,65	1,90	2,06
EZH1	0,76	1,77	1,17	1,20	1,3
EZH2	0,73	1,14	0,86	0,98	1,18
HDAC1	1,95	2,05	1,36	1,57	2,56
HDAC2	1,24	1,93	1,61	1,71	1,82
HDAC3	0,99	1,26	0,94	1,13	1,4
HELLS	1,27	1,75	1,24	1,38	1,9
HTATIP	1,35	1,45	1,41	1,47	1,78
INOC1	0,53	0,89	0,74	0,88	0,92
MBD3	0,63	1,02	0,23	0,23	0,11
MBD4	1,04	1,21	0,89	1,13	1,15
MBD5	1,01	0,85	0,56	0,53	0,73
MBD6	0,47	0,87	0,91	0,96	1,04
MECP2	0,71	1,31	0,94	0,86	0,9
MGA	0,69	1,11	0,82	0,94	1,11
MORF4L1	0,99	1,12	0,79	1,11	1,46

MORF4L2	0,73	1,16	0,92	1,13	1,32
MYST1	0,51	0,89	0,76	0,96	0,98
MYST2	0,61	1,2	0,9	1,02	1,41
NCOR1	0,9	1,31	1,28	1,43	1,54
NCOR2	0,64	1,26	0,79	0,94	1,31
PB1	0,63	0,87	0,83	0,92	1,02
PCAF	0,51	1,09	0,76	0,92	0,88
PHF21A	0,34	0,58	0,6	0,67	0,69
PRMT5	0,79	1,15	0,86	1,08	1,48
RAD54B	0,8	0,82	0,96	0,86	1,34
RAD54L	0,71	1,11	0,65	0,9	1,05
RBBP4	0,71	0,91	0,82	0,95	1,10
RCOR1	0,86	0,99	0,79	0,87	1,04
RFP	0,82	1,16	0,97	0,91	0,98
RUVBL1	0,98	1,11	0,82	1,10	1,35
RUVBL2	0,89	1,2	0,77	1,07	1,24
SIN3A	0,74	1,18	0,82	0,92	1,24
SMARCA1	0,32	0,89	0,88	0,79	0,83
SMARCA2	0,46	0,99	0,78	0,9	1,13
SMARCA3	0,66	0,89	0,69	0,86	1,11
SMARCA4	0,68	1,00	0,84	0,98	1,17
SMARCA5	0,74	1,19	0,86	0,93	1,08
SMARCA1	0,6	0,96	0,85	0,98	1,24
SMARCC1	0,68	0,94	0,84	1,00	1,11
SMARCC2	0,77	1,14	1,16	1,08	1,36
SMARCD1	0,75	1,04	0,69	0,89	1,06
SRCAP	0,64	1,31	0,85	0,96	1,25
SSRP1	0,68	1,02	0,89	1,00	1,19
SUPT16H	0,68	1,13	0,79	0,87	1,07
SUPT3H	0,4	0,88	0,79	0,96	0,88
SUZ12	0,62	0,93	0,72	0,76	0,84
TADA3L	0,49	0,98	0,83	1,05	1,05
TRDMT1	0,66	0,82	0,65	0,78	0,95
TRRAP	0,84	0,97	1,49	1,15	2,61
TTF2	0,64	0,98	0,7	0,83	1,14
YEATS4	0,55	0,9	0,71	0,72	0,87
ZRANB3	0,3	0,69	0,62	0,52	0,6

Tabelle 8.3: Spezifisches Genexpressionsprofil der NANOG1 A exprimierenden HEK-293wt-Zelllinie

Gene	Gene Name	Log2
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	5,3
NR1H4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	4,9
CP /// LOC100132553	ceruloplasmin (ferroxidase) /// similar to Ceruloplasmin precursor (Ferroxidase)	4,7
PLN	phospholamban	4,5
WISP3	WNT1 inducible signaling pathway protein 3	4,4
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	4,4
ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	4,2
BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	4,2
SLAMF8	SLAM family member 8	4
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	3,9
C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	3,8
CCDC85A	KIAA1912 protein	3,8
ARS2	arsenate resistance protein 2	3,7
PHKG2	phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)	3,7
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	3,6
EGR1	Putative zinc finger protein mRNA, 3' flank	3,4
MS4A15	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 15	3,4
GMFG	glia maturation factor, gamma	3,3
TRIM8	tripartite motif-containing 8	3,2
C15orf26	chromosome 15 open reading frame 26	3,2
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	3
BRD3	bromodomain containing 3	3
MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	2,7
EGR1	early growth response 1	2,6
C1orf67	chromosome 1 open reading frame 67	2,6
CCND2	cyclin D2	2,3
AQP4	aquaporin 4	2,3
TRGV5	T cell receptor gamma variable 5	2,3
CNGA4	cyclic nucleotide gated channel alpha 4 MRNA; cDNA DKFZp686O1079 (from clone	2,3
CNOT7	DKFZp686O1079)	2,2
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	2
FAM123B	family with sequence similarity 123B	2
LOC728537	hypothetical protein LOC728537	1,9
TNRC6C	trinucleotide repeat containing 6C	1,8
LIN37	lin-37 homolog (C. elegans)	1,7
C4orf39	chromosome 4 open reading frame 39	1,5
LOC552889	hypothetical protein LOC552889	1,4
GTF2H2B	general transcription factor IIH, polypeptide 2B	1,4
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	1,4
QSER1	glutamine and serine rich 1	1,4
RIT1	Small G protein RIBB	1,4

DNASE1	deoxyribonuclease I	1,4
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (<i>Drosophila</i>)	1,3
MCOLN3	CDNA FLJ36629 fis, clone TRACH2018273, moderately similar to Homo sapiens mucolipin (MCOLN1) mRNA	1,3
MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 10	1,3
UNC84A	unc-84 homolog A (<i>C. elegans</i>)	1,2
WDR68	WD repeat domain 68	1,2
DKFZp434L192	hypothetical protein DKFZp434L192	1,2
SLC16A1	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	1,2
DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	1,1
CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D	1,1
SETD8	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	1,1
TAF15	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa, mRNA (cDNA clone IMAGE:4148744)	1,1
LOC440934	(clone z177) retinal mRNA, repeat region	1,1
PCMTD1	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1 (PCMTD1), mRNA	1,1
MOSPD1	motile sperm domain containing 1	1,1
STX2	syntaxin 2	1
ID2 /// ID2B	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein /// inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein (pseudogene)	1
ATP13A3	ATPase type 13A3	1
CSAD	cysteine sulfinic acid decarboxylase	1
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	1
SETD8	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	1
USP25	ubiquitin specific peptidase 25	-1
RP5-1022P6.2	hypothetical protein KIAA1434	-1
EEA1	early endosome antigen 1	-1,1
DPH1 /// OVCA2	DPH1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) /// candidate tumor suppressor in ovarian cancer 2	-1,1
TRDMT1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1	-1,2
FOXO3	Forkhead protein (FKHRL1)	-1,2
TEX9	CDNA FLJ60522 complete cds	-1,2
DNM1P33	Hypothetical LOC554175, mRNA (cDNA clone MGC:11077 IMAGE:3688915)	-1,2
PTN	pleiotrophin	-1,3
CCDC121	coiled-coil domain containing 121	-1,3
GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	-1,6
EXT1	exostoses (multiple) 1	-1,6
MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	-1,7
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	-2,1
CDRT15	CMT1A duplicated region transcript 15	-2,4
DSCR6	Down syndrome critical region gene 6	-2,6
CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1	-2,6

C2orf53	chromosome 2 open reading frame 53	-2,9
ACY3	aspartoacylase (aminocyclase) 3	-3
FOXH1	forkhead box H1	-3,4
VSTM2A	V-set and transmembrane domain containing 2A	-3,8
CDK6	cyclin-dependent kinase 6	-3,9
PCDHA2	protocadherin alpha 2	-4,1
ITGBL1	Osteoblast specific cysteine-rich protein	-4,2

Tabelle 8.4: Spezifisches Genexpressionsprofil der NANOG1 D exprimierenden HEK-293wt-Zelllinie

Gene	Gene Name	Log2
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	5,6
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	4,9
C14orf53	chromosome 14 open reading frame 53	4,8
DIP2B	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila)	4,6
C8orf45	chromosome 8 open reading frame 45	4,2
POU3F1	POU class 3 homeobox 1	4
FLJ25694	hypothetical protein FLJ25694	4
TACR1	tachykinin receptor 1	3,5
SLC22A11	solute carrier family 22 (organic anion/urate transporter), member 11	3,3
KIAA0746	Homo sapiens, Similar to hypothetical protein LOC231238, clone IMAGE:4904751, mRNA	3
FFAR1	CDNA clone IMAGE:5303618	3
EGR1	Putative zinc finger protein mRNA, 3' flank	2,5
FAM150B	family with sequence similarity 150, member B	2,4
EGR1	early growth response 1	2,3
MOP-1	MOP-1	2,1
FOXE1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	1,4
CFDP1	craniofacial development protein 1	1,2
FAM86A	family with sequence similarity 86, member A	1,2
UNC84A	unc-84 homolog A (C. elegans)	1,1
EHF	ets homologous factor	1,1
DYNC2H1	dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1	1,1
GPR126	G protein-coupled receptor 126	1
XIST	X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	1
HAS2	hyaluronan synthase 2	-1
EED	embryonic ectoderm development	-1
PTN	pleiotrophin	-1
CEP290	centrosomal protein 290kDa	-1
CUL4A	Homo sapiens, clone IMAGE:3893153, mRNA	-1
TRIM7	tripartite motif-containing 7	-1
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	-1
SEMA6B	sema domain, transmembrane domain (TM), and	-1,1

	cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B	
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	-1,1
SEC22C	SEC22 vesicle trafficking protein homolog C (S. cerevisiae)	-1,1
PTPRA	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	-1,2
ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A	-1,3
TNKS2	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2	-1,3
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26	-1,3
ATE1	arginyltransferase 1	-1,3
FGL2	fibrinogen-like 2	-1,7
FZD9	frizzled homolog 9 (Drosophila)	-1,8
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C	-1,8
CDH8	cadherin 8, type 2	-2,1
KCNAB2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	-2,2
GOLGA8A /// GOLGA8B	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A /// golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B	-2,3
LOC441025	hypothetical gene supported by BC039667	-2,3
RBM35A	RNA binding motif protein 35A	-2,4
TBX2	T-box 2	-2,7
RRBP1	ES/130-related protein	-2,7
CLIC5	chloride intracellular channel 5	-2,9
PPP4R1L	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1-like	-2,9
MAPK8IP1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	-3,1
SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	-3,1
KCNH5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5	-3,2
ZDHC17	zinc finger, DHHC-type containing 17	-3,3
ZNF677	zinc finger protein 677	-3,3
ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	-3,3
STRA6	stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse)	-3,3
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-3,4
LOC100132661	PRO0419	-3,6
ACRBP	acrosin binding protein	-3,7
GOLGA8A	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	-3,9
AMN	amionless homolog (mouse)	-3,9
LRRC37B2	leucine rich repeat containing 37, member B2	-4,2

Tabelle 8.5: Spezifisches Genexpressionsprofil der NANOG1 E exprimierenden HEK-293wt-Zelllinie

Gene	Gene Name	Log
FN1	fibronectin 1	5,3
BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	5,3

FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	4,9
PTGDR	prostaglandin D2 receptor (DP)	4,6
FLJ32255	hypothetical protein LOC643977	4,4
MYLK3	myosin light chain kinase 3	4,4
C2orf21	chromosome 2 open reading frame 21	4,2
DCAKD	dephospho-CoA kinase domain containing	4
SSX4 /// SSX4B	synovial sarcoma, X breakpoint 4 /// synovial sarcoma, X breakpoint 4B	3,9
LOC100130155	hypothetical protein LOC100130155	3,9
TMPRSS11B	transmembrane protease, serine 11B	3,9
SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	3,7
COMP	cartilage oligomeric matrix protein	3,4
EGR1	Putative zinc finger protein mRNA, 3' flank	3,3
FCRL5	Fc receptor-like 5	3,1
DLG2	discs, large homolog 2 (Drosophila)	3,1
ARPP-21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21 kD	3
PR47	platelet receptor for type III collagen, 47 kDa	2,8
EGR1	early growth response 1	2,7
CCL14 /// CCL15	chemokine (C-C motif) ligand 14 /// chemokine (C-C motif) ligand 15	2,7
RGS13	regulator of G-protein signaling 13	2,7
PASD1	PAS domain containing 1	2,6
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	2,4
DICER1	dicer 1, ribonuclease type III	2,3
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2,2
ATN1	DRPLA	2,2
HEATR7A	HEAT repeat containing 7A	2,2
HGD /// LOC100132552 /// LOC727722	homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase) /// similar to homogentisate 1,2-dioxygenase /// homogentisate 1,2-dioxygenase like	2,2
AADAC	arylacetamide deacetylase (esterase)	2,1
PCDH7	protocadherin 7	2,1
PPP2R2B	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, beta isoform	2,1
NSUN6	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 6	1,9
GALNTL2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	1,9
NANOS3	nanos homolog 3 (Drosophila)	1,9
CRYAA	crystallin, alpha A	1,7
ITGB5	CDNA FLJ34276 fis, clone FEBRA2003520	1,7
ZNF224	CDNA FLJ78762 complete cds, highly similar to Homo sapiens zinc finger protein 224, mRNA	1,6
PDE3B	Cyclic nucleotide phosphodiesterase	1,4
KLHL31	kelch-like 31 (Drosophila)	1,4
NEK4	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 4	1,3
C7orf61	chromosome 7 open reading frame 61	1,1
MCTS1	malignant T cell amplified sequence 1	1,1

TDRD6	tudor domain containing 6	1,1
hCG_2020170	hCG2020170	1,1
FOXE1	forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	1
ATP6V0E1	Vacuolar proton-ATPase subunit M9.2	1
JMJD6	jumonji domain containing 6	1
MGA	KIAA0518 protein	1
TBX18	T-box 18	1
SON	SON DNA binding protein	-1
SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	-1
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	-1
CLCN5	chloride channel 5	-1
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	-1
CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	-1
YTHDC2	YTH domain containing 2	-1
PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	-1,1
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	-1,1
HK2	hexokinase 2	-1,1
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	-1,1
JMJD1C	jumonji domain containing 1C	-1,1
NCRNA00032	Clone IMAGE:2275835 C9orf14 mRNA, partial sequence; alternatively spliced	-1,1
EEA1	early endosome antigen 1	-1,3
HAS2	hyaluronan synthase 2	-1,3
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	-1,3
SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	-1,3
TRIM59	tripartite motif-containing 59	-1,3
BCOR	BCL6 co-repressor	-1,4
SELM	selenoprotein M	-1,4
ZNF496	zinc finger protein 496	-1,4
GABBR2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	-1,5
LOC100134128	similar to hCG15011	-1,6
CCND2	cyclin D2	-1,8
C7orf34	chromosome 7 open reading frame 34	-2,1
CHRNE	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon	-2,3
LMF1	lipase maturation factor 1	-2,4
FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b)	-2,5
PTPRJ	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1845189	-2,5
CA4	carbonic anhydrase IV	-2,8
USP22	ubiquitin specific peptidase 22	-3
LOC729124	hypothetical LOC729124	-3,4
LMO3	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)	-3,7
PKHD1L1	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1	-3,8
FBXL21	F-box and leucine-rich repeat protein 21	-3,8
LOC100129196	similar to hCG2033298	-3,9
FAM83B	family with sequence similarity 83, member B	-4

AFF3 /// MLL	AF4/FMR2 family, member 3 /// myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	-4,1
FAM44A	family with sequence similarity 44, member A	-4,6
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	-4,8
C3orf15	chromosome 3 open reading frame 15	-5,1

Lebenslauf

Name: Irina Eberle
Geburtsdatum: 06. November 1980
Geburtsort: Dschambul
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Schul Ausbildung

1986-1990 Grundschohle in Dschambul
1990-1997 Kestnerschule, Realschule, Wetzlar
1997-2000 Goetheschule, Oberstufengymnasium, Wetzlar
Abschluss: Abitur

Akademische Ausbildung

10/2000-11/2005 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main mit Schwerpunkt Biochemie und den Nebenfächern Genetik und Zellbiologie. Studienabschluss: Diplom-Biologin.
05/2005-11/2005 Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik und Zelluläre Mikrobiologie unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. T. Stein Thema der Arbeit: Das *Bacillus subtilis* Sekretom: Charakterisierung extrazellulärer Proteasen und Peptide.
Seit 12/2005 Promotion im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, am Institut der Pharmazeutischen Biologie, unter der Leitung von Prof. Dr. R. Marschalek.

Akademische Lehrer

Prof. Dr. R. Marschalek, Prof. Dr. T. Dingermann, Prof. Dr. K.-D. Entian, Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, Prof. Dr. J. Soppa und Prof. Dr. M. Karas.

Publikationen und Vorträge

New exon/intron structures of the human *NANOG1* and *NANOG2* genes and their transcriptional properties in t(4;11) leukemia cells

Irina Eberle, Birgit Pless, Miriam Braun, Theo Dingermann, Rolf Marschalek

Manuskript wird eingereicht.

The two reciprocal t(4;11) fusion proteins, MLL/AF4 and AF4/MLL, confer resistance to apoptosis, provide cell cycling capacity and upregulate the pluripotency gene *Nanog*

Anne Gaussmann, Till Wenger, Irina Eberle, Adelheid Bursen, Silvia Bracharz, Ingrid Herr, Theo Dingermann und Rolf Marschalek

2007 *Oncogene* 26: 3352-3363.

t(4;11) leukemia cells express the stem cell protein NANOG2

Vortrag auf der Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in

Wilsede, Juni 2009

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die gute Betreuung und für die guten Ideen, die meine Arbeit bereichert haben.

Prof. Dr. Theodor Dingermann gilt mein Dank für die interessanten Diskussionen während der Arbeitsseminare und die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung.

Prof. Dr. D. Steinhilber und Michael Ermisch gilt mein Dank für die Möglichkeit, in ihrem Labor Versuche durchführen zu können und für die wissenschaftlichen Ratschläge.

Dr. Ilse Zündorf danke ich für die Hilfsbereitschaft und die guten Tipps und Tricks, sowohl für den Laboralltag als auch während der Bio I-Praktika.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Dr. Anne Gaussmann, Dr. Sven Moritz, Dr. Clarissa Oehm und Dr. Sebastian Scharf danke ich für die Hilfe bei den alltäglichen Laborproblemen.

Bei Dr. Jens Rabenstein, Ute Steiner, Miriam Braun, Anne Benedikt, Nadine Spilger und Johanna Blees bedanke ich mich für die sehr schönen gemeinsamen Stunden außerhalb des Laboralltags.

Karen Schley, Sabrina Baltruschat, Dr. Adelheid Bursen, Jenny Hsieh, Birgit Pleß, Samaneh Sabiani möchte ich mich für das nette Klima im Labor und die interessanten Gespräche außerhalb des Labors bedanken.

Julia Hofmann, Freia Pfeil und vor allem Jenny Merkens und Silvia Bracharz danke ich für ihren großen Einsatz und die unterstützenden Gespräche.

Herzlicher Dank gilt Dr. Eric Kowarz und Dr. Claus Meyer für die Ideen, die in dieser Arbeit verwendet werden konnten.

Besonders möchte ich mich bei Johanna Blees, Ute Steiner und Miriam Braun bedanken für die vielen freundschaftlichen Gespräche, in denen nicht nur wissenschaftliche Probleme gelöst wurden.

Bei Nadine Spilger bedanke ich mich u.a. für das Aufspüren diverser „konnte“, „sollte“, „wurde“ beim Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Eltern und meiner wunderbaren Schwester danke ich sehr herzlich für ihre großartige Unterstützung, die mir besonders in den letzten Monaten eine wichtige Hilfe war. Danke für Alles!